

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
Colegiado dos Cursos de Pós-Graduação

**EFEITO DA FRAÇÃO DO EJACULADO E DO MÉTODO DE CONSERVAÇÃO  
SOBRE AS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DO SÊMEN SUÍNO E A  
FERTILIDADE DE FÊMEAS**

DIEGO VILELA ALKMIN

Belo Horizonte  
Escola de Veterinária – UFMG  
2010

DIEGO VILELA ALKMIN

**EFEITO DA FRAÇÃO DO EJACULADO E DO MÉTODO DE CONSERVAÇÃO  
SOBRE AS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DO SÊMEN SUÍNO E A  
FERTILIDADE DE FÊMEAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Reprodução Animal

Orientador: Prof. Dr. José Monteiro da Silva Filho

Belo Horizonte  
Escola de Veterinária – UFMG  
2010



*A415e Alkmin, Diego Vilela, 1982-*

*Efeito da fração do ejaculado e do método de conservação sobre as características físicas do sêmen suíno e a fertilidade de fêmeas / Diego Vilela Alkmin. – 2010.*

*226 p. : il.*

Orientador: José Monteiro da Silva Filho

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária

Inclui bibliografia

1. Suíno – Reprodução – Teses. 2. Sêmen – Resfriamento – Teses. 3. Inseminação artificial – Teses. 4. Sêmen – Fertilidade – Teses. I. Silva Filho, José Monteiro da. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

*CDD – 636.408 926*

Dissertação defendida e aprovada em 13 de abril de 2010, pela Comissão Examinadora constituída por:



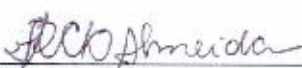
---

Prof. José Monteiro da Silva Filho  
Orientador



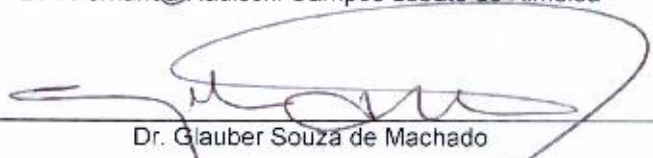
---

Dr. Isabel Regina Scheid



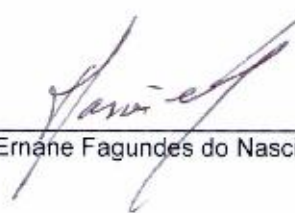
---

Dr. Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida



---

Dr. Glauber Souza de Machado



---

Prof. Ernane Fagundes do Nascimento



O correr da vida embrulha tudo.  
A vida é assim: esquenta e esfria,  
aperta e daí afrouxa,  
sossega e depois desinquieta.  
O que ela quer da gente é coragem.

Guimarães Rosa



“Se um dia já homem feito e realizado,  
sentires que a terra cede aos teus pés,  
que tuas obras desmoronaram,  
que não há ninguém a tua volta  
para te estender a mão,  
esquece a tua maturidade,  
passa pela tua mocidade,  
volta a tua infância e balbucie,  
entre lágrimas e esperança,  
As últimas palavras que sempre  
te restarão na alma:  
"Minha mãe, meu pai.”

(Autor desconhecido)

Aos meus pais, Geraldo e Marilda,  
pelo amor e apoio incondicional,  
e por sempre permitirem que eu  
busque as coisas em que acredito,

dedico...



## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida, saúde, proteção e por guiar meus passos colocando as oportunidades na minha vida;

Aos meus pais pelo exemplo que são em minha vida, e por sempre me apoiarem em todas as dificuldades;

Aos meus irmãos Patricia e Gustavo, pelo carinho, incentivo, e amizade; e por sempre se orgulharem de minhas conquistas, me dando força para buscar algo mais;

À Tati, por tudo que representa em minha vida...pelo amor e companheirismo, sempre acreditando em mim e fazendo com que eu acredite também, e pela compreensão nos muitos momentos de ausência;

Ao Professor José Monteiro da Silva Filho, pela orientação, confiança, amizade, conselhos e por todos ensinamentos que levarei sempre comigo; obrigado pela cobrança constante, sempre me incentivando a ir mais longe;

À professora Maristela Silveira Palhares, pela grande ajuda na execução das análises estatísticas, nunca poupando esforços para que tudo fosse feito da melhor forma;

Ao Sr. Décio Bruxel, proprietário da empresa DB-Danbred do Brasil, pela oportunidade da realização do experimento;

Ao Dr. Glauber Machado, Dr. Mário Pires e Dr. Vladimir Fortes pelo apoio, sugestões e colaboração na realização do experimento;

Aos funcionários da Granja Chuá pela colaboração imprescindível na execução desse experimento, em especial aos funcionários Valmir e Tiago, pelo companheirismo, amizade, e por sempre estarem dispostos a ajudar ao máximo para que tudo desse certo;

Aos funcionários da Granja Mandassaia Nilton e Cristina, pelo acolhimento ao longo dos oito meses que lá morei, pela amizade construída, e por estarem sempre disponíveis a ajudar;

Aos colegas de pós-graduação do Setor de Reprodução Animal, pela convivência tanto nos momentos alegres quanto nos mais difíceis;

Às colegas de orientação Amanda Siqueira, Amanda Sales, Alice, Rute, Raissa e principalmente Carol e Laura por toda ajuda até o final desse trabalho;

À Amanda Siqueira em especial, por todas sugestões, troca de idéias e informações, e por toda ajuda e amizade nesses dois anos;

Aos estagiários Natália e Estevão por toda ajuda na execução do experimento;

Aos amigos de República, Carlos, Karen, Isabel, Renato, Gustavo, Marcus, Glauco, Erica, pelo convívio e muitos momentos agradáveis juntos, e em especial ao Endrigo e Bruno, pelos conselhos, momentos de desabafo e amizade construída durante esses anos;

Ao grande amigo Serginho pelo apoio e preocupação, sempre ajudando e incentivando a buscar meus objetivos;

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade em colaborar, com valiosas sugestões que certamente enriqueceram e valorizaram esse trabalho;

Aos professores do Departamento de Reprodução Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro por participarem da minha formação, e em especial à Prof. Vera Lúcia Teixeira de Jesus pelas oportunidades, e por sempre me incentivar a fazer o mestrado;

À UFMG e à Escola de Veterinária, pela oportunidade de realização do curso;

Aos professores da Escola de Veterinária, que de alguma forma ajudaram em minha formação;

Aos funcionários da Escola de Veterinária pela ajuda;

À Fapemig pela concessão de bolsa de estudo no período final do mestrado;

A todos que de alguma forma colaboraram para a idealização e finalização desse experimento;

Muito obrigado.

---

## SUMÁRIO

---

	<b>RESUMO.....</b>	27
	<b>ABSTRACT.....</b>	28
<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	29
<b>2.</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	30
<b>2.1</b>	Frações do ejaculado do varrão.....	30
<b>2.2</b>	Características físicas e morfológicas do sêmen.....	31
<b>2.2.1</b>	Coloração e aspecto do sêmen.....	31
<b>2.2.2</b>	Volume do sêmen.....	31
<b>2.2.3</b>	Motilidade e vigor espermáticos.....	31
<b>2.2.4</b>	Aglutinação espermática.....	32
<b>2.2.5</b>	Concentração espermática.....	33
<b>2.2.6</b>	Morfologia espermática.....	33
<b>2.2.7</b>	Pressão osmótica e pH do sêmen.....	36
<b>2.3</b>	Plasma seminal e seus componentes.....	37
<b>2.3.1</b>	Espermadesinas e suas funções.....	40
<b>2.3.2</b>	Afinidade das espermadesinas.....	43
<b>2.4</b>	Fatores a serem considerados no processo de resfriamento e/ou transporte do sêmen diluído de varrões.....	44
<b>2.4.1</b>	Individualidade dos varrões.....	44
<b>2.4.2</b>	Tipo de colheita do sêmen: total ou fracionada.....	44
<b>2.4.2.1</b>	Características físicas do sêmen de varrões submetidos a colheita total ou fracionada e armazenado <i>in vitro</i> à diferentes temperaturas e períodos de estocagem.....	47
<b>2.4.2.2</b>	Fertilidade do sêmen de varrões submetidos a colheita total ou fracionada.....	49
<b>2.4.3</b>	Tempo para a diluição do sêmen.....	50
<b>2.4.4</b>	Diluidores de sêmen suíno.....	51
<b>2.4.4.1</b>	Componentes dos diluidores.....	51
<b>2.4.4.1.1</b>	Água.....	51
<b>2.4.4.1.2</b>	Açúcares.....	52
<b>2.4.4.1.3</b>	Eletrólitos.....	53
<b>2.4.4.1.4</b>	Macromoléculas.....	53
<b>2.4.4.1.4.1</b>	Gema de ovo.....	53
<b>2.4.4.1.4.2</b>	Albumina sérica bovina.....	54
<b>2.4.4.1.5</b>	Tampões.....	55
<b>2.4.4.1.6</b>	Quelantes.....	55
<b>2.4.4.1.7</b>	Antioxidantes.....	55
<b>2.4.4.1.8</b>	Antibióticos.....	56
<b>2.4.4.2</b>	Tipos de diluidores do sêmen de varrões.....	56
<b>2.4.4.3</b>	Regulação do pH e da pressão osmótica.....	61
<b>2.4.4.4</b>	Controle da qualidade microbiológica do sêmen.....	61
<b>2.4.5</b>	Efeito da taxa de diluição, volume da dose inseminante e concentração espermática por mL e por dose inseminante.....	62
<b>2.4.6</b>	Tempo de incubação prévia do sêmen "holding time".....	66
<b>2.4.7</b>	Efeito da taxa de resfriamento do sêmen de varrões em contêiner especial.....	67
<b>2.4.8</b>	Influência da temperatura final de armazenamento do sêmen.....	71

2.4.9	Duração da estocagem do sêmen de varrões.....	72
2.4.10	Técnicas utilizadas para melhorar a qualidade espermática.....	73
2.4.10.1	Prostaglandinas.....	73
2.4.10.2	Ácido Hialurônico.....	74
2.4.10.3	Cafeína.....	74
2.4.11	Condições ideais de estocagem e utilização do sêmen de varrões.....	75
2.5	Endocrinologia da fêmea suína.....	76
2.5.1	Período pós-parto.....	76
2.5.2	Período pós-desmame.....	76
2.5.3	Intervalo desmame-estro.....	77
2.5.3.1	Fatores que afetam o intervalo desmame-estro (IDE).....	78
2.5.3.1.1	Exposição ao macho.....	78
2.5.3.1.2	Duração da lactação.....	78
2.5.3.1.3	Ordem de parto.....	79
2.5.3.1.4	Linhagem das fêmeas.....	80
2.5.4	Duração e período de manifestação do estro.....	80
2.6	Inseminação Artificial em suínos.....	81
2.6.1	Local de deposição do sêmen.....	82
2.6.1.1	Técnicas cirúrgicas.....	82
2.6.1.2	Técnicas não-cirúrgicas.....	83
2.6.1.2.1	Inseminação Cervical Tradicional (ICT).....	83
2.6.1.2.2	Inseminação intrauterina (IIU).....	83
2.6.1.2.3	Inseminação intrauterina profunda (IIP).....	83
2.6.2	Momento ideal da inseminação.....	84
2.6.3	Número e intervalo entre inseminações.....	85
3.	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	87
3.1	Localização, período do experimento e dados meteorológicos durante a fase experimental.....	87
3.2.	Delineamento Experimental e Animais utilizados.....	88
3.2.1	Experimento I: Efeito da fração do ejaculado e do protocolo de resfriamento sobre as características físicas e morfológicas do sêmen de varrões, avaliadas à diferentes períodos de estocagem a 5 ou 17°C, em contêiner especial.....	88
3.2.2	Experimento II: Fertilidade de fêmeas suínas inseminadas com sêmen oriundo de duas frações do ejaculado, submetidos a dois protocolos de resfriamento à 5 ou 17°C.....	89
3.3	Procedimentos relacionados ao varrão.....	90
3.3.1	Manejo reprodutivo e nutricional.....	90
3.3.2	Coleta do sêmen.....	90
3.3.3	Avaliação física do sêmen.....	91
3.3.4	Processamento do sêmen.....	92
3.3.4.1	Diluição do sêmen.....	92
3.3.4.2	Preparação dos diluidores.....	93
3.3.4.3	Resfriamento e armazenamento do sêmen.....	94
3.3.4.4	Avaliação do sêmen resfriado.....	95
3.4	Procedimentos relacionados às fêmeas.....	96
3.4.1	Manejo reprodutivo e nutricional.....	96
3.4.2	Intervalo desmame-estro, manifestação e duração do estro.....	96
3.4.3	Inseminação Artificial e rufiação de retorno ao cio.....	97

3.4.4	Eficiência reprodutiva.....	98
3.5	Análises estatísticas.....	98
4.	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	99
4.1	EXPERIMENTO I: Efeito da fração do ejaculado e do protocolo de resfriamento sobre as características físicas e morfológicas do sêmen de varrões, avaliadas à diferentes períodos de estocagem à 5°C ou 17°C, em contêiner especial.....	99
4.1.1	Características do sêmen e desempenho reprodutivo dos varrões.....	99
4.1.2	Características físicas do sêmen diluído e resfriado a 5 ou 17°C por 0, 12, 24, 36, 48 e 72 horas de armazenamento, em contêiner especial.....	103
4.1.3	Características morfológicas do sêmen diluído, resfriado a 5 ou 17°C e armazenado por 0, 12, 24, 36, 48 e 72 horas em contêiner especial.....	106
4.2	EXPERIMENTO II: Fertilidade de fêmeas suínas inseminadas com sêmen oriundo de duas frações do ejaculado, submetidas a dois protocolos de resfriamento à 5°C ou 17°C.....	114
4.2.1	Características físicas do sêmen e desempenho reprodutivo dos varrões.....	114
4.2.2	Período de conservação do sêmen.....	116
4.2.3	Características do sêmen diluído e resfriado no momento de cada inseminação artificial.....	117
4.2.4	Parâmetros de controle de fêmeas suínas inseminadas com sêmen diluído e resfriado a 5°C ou 17°C.....	120
4.2.4.1	Manifestação do cio.....	124
4.2.4.2	Intervalo do início do cio à inseminação.....	124
4.2.4.3	Número médio de inseminações.....	124
4.2.5	Fertilidade de fêmeas suínas inseminadas com sêmen diluído e resfriado a 5°C ou 17°C em contêiner especial.....	125
4.3	Características físicas do sêmen e desempenho reprodutivo dos varrões dos Experimentos I e II.....	133
5.	<b>CONCLUSÕES.....</b>	135
6.	<b>PROPOSTAS FUTURAS.....</b>	135
7.	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	136
8.	<b>ANEXOS.....</b>	166
	Anexos I, II e III: Análises Estatísticas.....	166
	Anexo IV: Ficha de controle do sêmen dos varrões, oriundos da Fração 1 do ejaculado.....	218
	Anexo V: Ficha de controle do sêmen dos varrões, oriundos da Fração 2 do ejaculado.....	219
	Anexo VI: Ficha de avaliação do sêmen dos varrões, nos diferentes períodos de estocagem.....	220
	Anexo VII: Ficha de controle reprodutivo individual das porcas inseminadas.....	221
	Anexo VIII: Ficha utilizada para o controle dos partos.....	222
	Anexo IX. Contêiner utilizado.....	223
	Anexo X. Coleta das duas frações do ejaculado.....	224
	Anexo XI. Manejo das fêmeas e inseminação artificial.....	225
	Anexo XII. Morfologia espermática.....	226

---

---

## LISTA DE TABELAS

---

Tabela 1 -	Critérios básicos para a avaliação do sêmen suíno a ser utilizado na inseminação artificial.....	36
Tabela 2 -	Classificação dos diluidores como de curta ou de longa duração.....	57
Tabela 3 -	Composição e classificação de alguns diluidores usados na preservação do sêmen suíno.....	58
Tabela 4 -	Etapas a serem seguidas desde a coleta do sêmen até a preparação das doses inseminantes.....	62
Tabela 5 -	Duração do estro (DE), intervalo estro-ovulação (IEO) e momento da ovulação em relação à duração do estro (IEO/DE), em porcas e marrãs.....	81
Tabela 6 -	Efeito do número de inseminações sobre a taxa de prenhes, nascidos totais e vivos de fêmeas suínas.....	87
Tabela 7.	Dados meteorológicos médios do período experimental.....	88
Tabela 8 -	Distribuição das fêmeas por ordem de parto, dentro de cada tratamento.....	89
Tabela 9 -	Frequência de utilização dos reprodutores suínos nas matrizes, quanto ao número de inseminações/tratamento.....	90
Tabela 10 -	Níveis nutricionais da ração fornecida aos varrões durante o experimento.....	90
Tabela 11 -	Composição do diluidor Glicina-gema de ovo (Foote, 2002).....	93
Tabela 12 -	Níveis nutricionais das rações utilizadas pelas fêmeas durante o experimento.....	96
Tabela 13 -	Características físicas do sêmen e desempenho reprodutivo dos varrões utilizados no Experimento I, de acordo com a fração do ejaculado utilizada.....	100
Tabela 14 -	Influência da fração do ejaculado sobre a cor/aspecto do sêmen <i>in natura</i> no Experimento I.....	102
Tabela 15 -	Número de aglutinações no sêmen <i>in natura</i> de acordo com a fração do ejaculado, no Experimento I.....	102
Tabela 16 -	Efeito do diluidor, fração, tempo e suas interações sobre as características físicas do sêmen diluído e resfriado.....	103

Tabela 17 -	Características físicas do sêmen diluído e resfriado à 5 ou 17°C por 0, 12, 24, 36, 48 e 72 horas de armazenamento, em contêiner especial.....	104
Tabela 18 -	Percentagens de espermatozóides morfológicamente normais nos diferentes tratamentos e tempos de estocagem do sêmen.....	107
Tabela 19 -	Percentagens de espermatozóides com defeitos de cabeça nos diferentes tratamentos e tempos de estocagem do sêmen.....	108
Tabela 20 -	Percentuais de espermatozóides com defeito de peça intermediária nos diferentes tratamentos e tempos de estocagem do sêmen.....	108
Tabela 21 -	Percentuais de espermatozóides com defeito de cauda nos diferentes tratamentos e tempos de estocagem do sêmen.....	109
Tabela 22 -	Percentuais de espermatozóides com defeito de acrossoma nos diferentes tratamentos e tempos de estocagem do sêmen.....	111
Tabela 23 -	Percentuais de espermatozóides apresentando gota proximal nos diferentes tratamentos e tempos de estocagem do sêmen.....	112
Tabela 24 -	Percentuais de espermatozóides apresentando gota distal nos diferentes tratamentos e tempos de estocagem do sêmen.....	112
Tabela 25 -	Percentual de defeitos totais nos espermatozóides entre os tratamentos nos diferentes tempos.....	113
Tabela 26 -	Características físicas do sêmen e desempenho reprodutivo dos varrões utilizados no Experimento II, de acordo com a fração do ejaculado utilizado.....	114
Tabela 27 -	Influência da fração do ejaculado sobre a cor/aspecto do sêmen <i>in natura</i> no Experimento II.....	116
Tabela 28 -	Número de aglutinações no sêmen <i>in natura</i> de acordo com a fração do ejaculado, no Experimento II.....	116
Tabela 29 -	Períodos de estocagem do sêmen resfriado dos varrões entre os tratamentos, nas quatro inseminações.....	117
Tabela 30 -	Efeito da fração do ejaculado e do protocolo de resfriamento, sobre características físicas do sêmen diluído de varrões, no momento da primeira inseminação.....	118
Tabela 31 -	Efeito da fração do ejaculado e do protocolo de resfriamento, sobre características do sêmen diluído de varrões, no momento da segunda inseminação.....	119

Tabela 32 -	Efeito da fração do ejaculado e do protocolo de resfriamento, sobre características do sêmen diluído de varrões, no momento da terceira inseminação.....	119
Tabela 33 -	Efeito da fração do ejaculado e do protocolo de resfriamento, sobre características físicas do sêmen diluído de varrões, no momento da quarta inseminação.....	120
Tabela 34 -	Parâmetros de controle de fêmeas suínas, inseminadas com sêmen diluído e resfriado a 5° ou 17°C, em contêiner especial.....	121
Tabela 35 -	Parâmetros de controle de fêmeas suínas inseminadas com sêmen diluído e resfriado a 5° ou 17°C, independentemente da fração do ejaculado.....	122
Tabela 36 -	Parâmetros de controle de fêmeas suínas, inseminadas com sêmen oriundo de duas frações do ejaculado, independentemente do protocolo de resfriamento utilizado (5 ou 17°C).....	123
Tabela 37 -	Intervalo de tempo da colheita do sêmen à inseminação artificial e a duração da mesma, considerando-se a fração do ejaculado e o protocolo de resfriamento do sêmen.....	123
Tabela 38 -	Frequência de manifestação do cio em porcas, ao longo do dia, por tratamento.....	124
Tabela 39 -	Distribuição do número de inseminações artificiais realizadas por fêmea e por tratamento.....	125
Tabela 40 -	Efeito dos tratamentos, da fração e do diluidor sobre a fertilidade de porcas inseminadas com sêmen diluído e resfriado (Qui-quadrado).....	126
Tabela 41 -	Efeito da fração do ejaculado e do protocolo de resfriamento do sêmen diluído de varrões sobre a fertilidade de porcas inseminadas.....	126
Tabela 42 -	Efeito da fração do ejaculado sobre a fertilidade de porcas inseminadas com sêmen diluído e resfriado.....	127
Tabela 43 -	Efeito do protocolo de resfriamento do sêmen sobre a fertilidade de porcas inseminadas.....	127
Tabela 44 -	Características físicas do sêmen e desempenho reprodutivo dos varrões utilizados nos Experimentos I e II.....	134
Tabela 45 -	Influência da fração do ejaculado sobre a cor/aspecto do sêmen <i>in natura</i> nos Experimentos I e II.....	134
Tabela 46 -	Número de aglutinações no sêmen <i>in natura</i> de acordo com a fração do ejaculado, nos Experimentos I e II.....	134

Tabela 47 - Dados referentes aos parâmetros de controle de fêmeas suínas, inseminadas com sêmen diluído e resfriado a 5° ou 17°C, em contêiner especial.....202

---

**LISTA DE ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

<b>I</b>	<b>Análises estatísticas referentes ao Experimento I.....</b>	<b>166</b>
<b>Ia</b>	<b>Análises estatísticas referentes à tabela 13.....</b>	<b>166</b>
<b>Análise 1</b>	Comparação do volume de sêmen entre as frações 1 e 2.....	166
<b>Análise 2</b>	Comparação da motilidade espermática entre as frações 1 e 2 (arcsen√%).....	166
<b>Análise 3</b>	Comparação do vigor espermático entre as frações 1 e 2.....	166
<b>Análise 4</b>	Comparação do número de espermatozóides por mL entre as frações 1 e 2.....	166
<b>Análise 5</b>	Comparação do número de espermatozóides móveis/mL entre as frações 1 e 2.....	166
<b>Análise 6</b>	Comparação do número de espermatozóides totais entre as frações 1 e 2.....	166
<b>Análise 7</b>	Comparação do número total de espermatozóides móveis entre as frações 1 e 2.....	166
<b>Análise 8</b>	Comparação do volume de sêmen utilizado por dose inseminante, entre as frações 1 e 2.....	167
<b>Análise 9</b>	Comparação do volume de diluidor utilizado por dose inseminante entre as frações 1 e 2.....	167
<b>Análise 10</b>	Comparação do número potencial de porcas inseminadas entre as frações 1 e 2.....	167
<b>Análise 11</b>	Comparação do tempo da colheita à diluição do sêmen entre as frações 1 e 2.....	167
<b>Análise 12</b>	Comparação do tempo da colheita ao resfriamento do sêmen entre as frações 1 e 2.....	167
<b>Ib</b>	<b>Análises estatísticas referentes à tabela 17.....</b>	<b>167</b>
<b>Análise 13</b>	Efeito da fração do ejaculado, do protocolo de resfriamento e do tempo de estocagem, bem como de suas interações sobre a motilidade espermática (arcsen√%).....	167
<b>Análise 14</b>	Comparação da motilidade espermática entre os tratamentos, às zero horas de estocagem.....	168
<b>Análise 15</b>	Comparação da motilidade espermática entre os tratamentos, às 12 horas de estocagem.....	168
<b>Análise 16</b>	Comparação da motilidade espermática entre os tratamentos, às 24 horas de estocagem.....	168
<b>Análise 17</b>	Comparação da motilidade espermática entre os tratamentos, às 36 horas de estocagem.....	168
<b>Análise 18</b>	Comparação da motilidade espermática entre os tratamentos, às 48 horas de estocagem.....	169
<b>Análise 19</b>	Comparação da motilidade espermática entre os tratamentos, às 72 horas de estocagem.....	169
<b>Análise 20</b>	Comparação da motilidade espermática no tratamento F1T1, entre os diferentes tempos de armazenamento.....	169
<b>Análise 21</b>	Comparação da motilidade espermática no tratamento F1T2, entre os diferentes tempos de armazenamento.....	170
<b>Análise 22</b>	Comparação da motilidade espermática no tratamento F2T1, entre os diferentes tempos de armazenamento.....	170
<b>Análise 23</b>	Comparação da motilidade espermática no tratamento F2T2, entre os diferentes tempos de armazenamento.....	171
<b>Análise 24</b>	Comparação do vigor espermático entre os tratamentos, às zero horas de estocagem.....	171
<b>Análise 25</b>	Comparação do vigor espermático entre os tratamentos, às 12 horas de estocagem.....	171
<b>Análise 26</b>	Comparação do vigor espermático entre os tratamentos, às 24 horas de estocagem.....	171
<b>Análise 27</b>	Comparação do vigor espermático entre os tratamentos, às 36 horas de estocagem.....	172
<b>Análise 28</b>	Comparação do vigor espermático entre os tratamentos, às 48 horas de estocagem.....	172
<b>Análise 29</b>	Comparação do vigor espermático entre os tratamentos, às 72 horas de estocagem.....	172
<b>Análise 30</b>	Comparação do vigor espermático no tratamento F1T1, entre os diferentes tempos de armazenamento.....	172
<b>Análise 31</b>	Comparação do vigor espermático no tratamento F1T2, entre os diferentes tempos de armazenamento.....	173
<b>Análise 32</b>	Comparação do vigor espermático no tratamento F2T1, entre os diferentes tempos de armazenamento.....	173
<b>Análise 33</b>	Comparação do vigor espermático no tratamento F2T2, entre os diferentes tempos de armazenamento.....	174
<b>Ic</b>	<b>Análises estatísticas referentes à tabela 18.....</b>	<b>174</b>
<b>Análise 34</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides normais entre as frações 1 e 2 no sêmen fresco (arcsen√%).....	174
<b>Análise 35</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides normais entre os tratamentos no tempo 0 horas (arcsen√%).....	174

<b>Análise 36</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides normais entre os tratamentos no tempo 12 horas (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	174
<b>Análise 37</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides normais entre os tratamentos no tempo 24 horas (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	175
<b>Análise 38</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides normais entre os tratamentos no tempo 36 horas (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	175
<b>Análise 39</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides normais entre os tratamentos no tempo 48 horas (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	175
<b>Análise 40</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides normais entre os tratamentos no tempo 72 horas (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	175
<b>Análise 41</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides normais nos diferentes tempos para o tratamento F1T1 (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	176
<b>Análise 42</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides normais nos diferentes tempos para o tratamento F1T2 (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	176
<b>Análise 43</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides normais nos diferentes tempos para o tratamento F2T1 (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	176
<b>Análise 44</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides normais nos diferentes tempos para o tratamento F2T2 (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	176
<b>Id</b>	<b>Análises estatísticas referentes à tabela 19.....</b>	176
<b>Análise 45</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de cabeça entre as frações 1 e 2 no sêmen fresco (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	176
<b>Análise 46</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de cabeça entre os tratamentos no tempo 0 horas (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	177
<b>Análise 47</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de cabeça entre os tratamentos no tempo de 12 horas (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	177
<b>Análise 48</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de cabeça entre os tratamentos no tempo de 24 horas (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	177
<b>Análise 49</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de cabeça entre os tratamentos no tempo de 36 horas (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	177
<b>Análise 50</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de cabeça entre os tratamentos no tempo de 48 horas (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	178
<b>Análise 51</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de cabeça entre os tratamentos no tempo de 72 horas (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	178
<b>Análise 52</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de cabeça nos diferentes tempos para o tratamento F1T1 (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	178
<b>Análise 53</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de cabeça nos diferentes tempos para o tratamento F1T2 (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	178
<b>Análise 54</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de cabeça nos diferentes tempos para o tratamento F2T1 (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	179
<b>Análise 55</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de cabeça nos diferentes tempos para o tratamento F2T2 (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	179
<b>Ie</b>	<b>Análises estatísticas referentes à tabela 20.....</b>	179
<b>Análise 56</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de peça intermediária entre as frações 1 e 2 no sêmen fresco (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	179
<b>Análise 57</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de peça intermediária entre os tratamentos no tempo de 0 horas (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	179
<b>Análise 58</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de peça intermediária entre os tratamentos no tempo de 12 horas (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	180
<b>Análise 59</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de peça intermediária entre os tratamentos no tempo de 24 horas (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	180
<b>Análise 60</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de peça intermediária entre os tratamentos no tempo de 36 horas (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	180
<b>Análise 61</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de peça intermediária entre os tratamentos no tempo de 48 horas (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	180
<b>Análise 62</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de peça intermediária entre os tratamentos no tempo de 72 horas (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	181

<b>Análise 63</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de peça intermediária nos diferentes tempos para o tratamento FIT1 (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	181
<b>Análise 64</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de peça intermediária nos diferentes tempos para o tratamento FIT2 (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	181
<b>Análise 65</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de peça intermediária nos diferentes tempos para o tratamento F2T1 (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	181
<b>Análise 66</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de peça intermediária nos diferentes tempos para o tratamento F2T2 (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	182
<b>If</b>	<b>Análises estatísticas referentes à tabela 21.....</b>	182
<b>Análise 67</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de cauda entre as frações 1 e 2 no sêmen fresco (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	182
<b>Análise 68</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de cauda entre os tratamentos no tempo de 0 horas (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	182
<b>Análise 69</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de cauda entre os tratamentos no tempo de 12 horas (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	182
<b>Análise 70</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de cauda entre os tratamentos no tempo de 24 horas (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	183
<b>Análise 71</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de cauda entre os tratamentos no tempo de 36 horas .....	183
<b>Análise 72</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de cauda entre os tratamentos no tempo de 48 horas (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	183
<b>Análise 73</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de cauda entre os tratamentos no tempo de 72 horas (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	183
<b>Análise 74</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de cauda nos diferentes tempos para o tratamento FIT1 (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	184
<b>Análise 75</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de cauda nos diferentes tempos para o tratamento FIT2 (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	184
<b>Análise 76</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de cauda nos diferentes tempos para o tratamento F2T1 (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	184
<b>Análise 77</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de cauda nos diferentes tempos para o tratamento F2T2 (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	184
<b>Ig</b>	<b>Análises estatísticas referentes à tabela 22.....</b>	185
<b>Análise 78</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de acrossoma entre as frações 1 e 2 no sêmen fresco (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	185
<b>Análise 79</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de acrossoma entre os tratamentos no tempo de 0 horas (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	185
<b>Análise 80</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de acrossoma entre os tratamentos no tempo de 12 horas (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	185
<b>Análise 81</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de acrossoma entre os tratamentos no tempo de 24 horas (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	185
<b>Análise 82</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de acrossoma entre os tratamentos no tempo de 36 horas (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	186
<b>Análise 83</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de acrossoma entre os tratamentos no tempo de 48 horas (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	186
<b>Análise 84</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de acrossoma entre os tratamentos no tempo de 72 horas (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	186
<b>Análise 85</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de acrossoma nos diferentes tempos para o tratamento FIT1 (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	186
<b>Análise 86</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de acrossoma nos diferentes tempos para o tratamento FIT2 (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	187
<b>Análise 87</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de acrossoma nos diferentes tempos para o tratamento F2T1 (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	187
<b>Análise 88</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de acrossoma nos diferentes tempos para o tratamento F2T2 (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	187
<b>Ih</b>	<b>Análises estatísticas referentes à tabela 23.....</b>	187
<b>Análise 89</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando gota proximal entre as frações 1 e 2 no sêmen fresco (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	187
<b>Análise 90</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando gota proximal entre os tratamentos no tempo de 0 horas (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	188

<b>Análise 91</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando gota proximal entre os tratamentos no tempo de 12 horas (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	188
<b>Análise 92</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando gota proximal entre os tratamentos no tempo de 24 horas (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	188
<b>Análise 93</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando gota proximal entre os tratamentos no tempo de 36 horas (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	188
<b>Análise 94</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando gota proximal entre os tratamentos no tempo de 48 horas (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	189
<b>Análise 95</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando gota proximal entre os tratamentos no tempo de 72 horas (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	189
<b>Análise 96</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando gota proximal nos diferentes tempos para o tratamento F1T1 (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	189
<b>Análise 97</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando gota proximal nos diferentes tempos para o tratamento F1T2 (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	189
<b>Análise 98</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando gota proximal nos diferentes tempos para o tratamento F2T1 (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	190
<b>Análise 99</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando gota proximal nos diferentes tempos para o tratamento F2T2 (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	190
<b>Ii</b>	<b>Análises estatísticas referentes à tabela 24.....</b>	190
<b>Análise 100</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando gota distal entre as frações 1 e 2 no sêmen fresco (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	190
<b>Análise 101</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando gota distal entre os tratamentos no tempo de 0 horas (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	190
<b>Análise 102</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando gota distal entre os tratamentos no tempo de 12 horas (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	191
<b>Análise 103</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando gota distal entre os tratamentos no tempo de 24 horas (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	191
<b>Análise 104</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando gota distal entre os tratamentos no tempo de 36 horas (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	191
<b>Análise 105</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando gota distal entre os tratamentos no tempo de 48 horas (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	191
<b>Análise 106</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando gota distal entre os tratamentos no tempo de 72 horas (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	192
<b>Análise 107</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando gota distal nos diferentes tempos para o tratamento F1T1 (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	192
<b>Análise 108</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando gota distal nos diferentes tempos para o tratamento F1T2 (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	192
<b>Análise 109</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando gota distal nos diferentes tempos para o tratamento F2T1 (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	192
<b>Análise 110</b>	Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando gota distal nos diferentes tempos para o tratamento F2T2 (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	193
<b>Ij</b>	<b>Análises estatísticas referentes à tabela 25.....</b>	193
<b>Análise 111</b>	Comparação da percentagem de defeitos espermáticos totais entre as frações 1 e 2 no sêmen fresco (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	193
<b>Análise 112</b>	Comparação da percentagem de defeitos espermáticos totais entre os tratamentos no tempo de 0 horas (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	193
<b>Análise 113</b>	Comparação da percentagem de defeitos espermáticos totais entre os tratamentos no tempo de 12 horas (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	193
<b>Análise 114</b>	Comparação da percentagem de defeitos espermáticos totais entre os tratamentos no tempo de 24 horas (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	194
<b>Análise 115</b>	Comparação da percentagem de defeitos espermáticos totais entre os tratamentos no tempo de 36 horas (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	194
<b>Análise 116</b>	Comparação da percentagem de defeitos espermáticos totais entre os tratamentos no tempo de 48 horas (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	194
<b>Análise 117</b>	Comparação da percentagem de defeitos espermáticos totais entre os tratamentos no tempo de 72 horas (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	194

Análise 118	Comparação da percentagem de defeitos espermáticos totais nos diferentes tempos para o tratamento F1T1 (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	195
Análise 119	Comparação da percentagem de defeitos espermáticos totais nos diferentes tempos para o tratamento F1T2 (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	195
Análise 120	Comparação da percentagem de defeitos espermáticos totais nos diferentes tempos para o tratamento F2T1 (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	195
Análise 121	Comparação da percentagem de defeitos espermáticos totais nos diferentes tempos para o tratamento F2T2 (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	195
<b>II</b>	<b>Análises estatísticas referentes ao Experimento II.....</b>	<b>196</b>
<b>IIa</b>	<b>Análises estatísticas referentes à tabela 8 (Material e métodos).....</b>	<b>196</b>
Análise 122	Comparação da distribuição das fêmeas por ordem de parto dentro de cada tratamento.....	196
<b>IIb</b>	<b>Análises estatísticas referentes à tabela 9 (Material e métodos).....</b>	<b>196</b>
Análise 123	Comparação da frequência de utilização dos reprodutores suínos nas matrizes, por tratamento.....	196
<b>IIc</b>	<b>Análises estatísticas referentes à tabela 26.....</b>	<b>196</b>
Análise 124	Comparação do volume de sêmen entre as frações 1 e 2 do ejaculado.....	196
Análise 125	Comparação da motilidade espermática do sêmen a fresco (arcsen $\sqrt{\%}$ ) entre as frações 1 e 2.....	196
Análise 126	Comparação do vigor espermático do sêmen a fresco entre as frações 1 e 2.....	196
Análise 127	Comparação da concentração espermática por mL entre as frações 1 e 2.....	197
Análise 128	Comparação do número de espermatozóides móveis/mL entre as frações 1 e 2.....	197
Análise 129	Comparação do número de espermatozóides totais do ejaculado entre as frações 1 e 2.....	197
Análise 130	Comparação do número total de espermatozóides móveis entre as frações 1 e 2.....	197
Análise 131	Comparação do volume de sêmen por dose inseminante entre as frações 1 e 2.....	197
Análise 132	Comparação do volume de diluidor por dose inseminante entre as frações 1 e 2.....	197
Análise 133	Comparação do número potencial de fêmeas inseminadas entre as frações 1 e 2.....	197
Análise 134	Comparação do número real de fêmeas inseminadas entre as frações 1 e 2.....	198
Análise 135	Comparação do tempo da colheita do sêmen à diluição entre as frações 1 e 2.....	198
Análise 136	Comparação do tempo da colheita do sêmen ao resfriamento entre as frações 1 e 2.....	198
<b>IId</b>	<b>Análises estatísticas referentes à tabela 30.....</b>	<b>198</b>
Análise 137	Comparação da motilidade espermática (arcsen $\sqrt{\%}$ ) entre os tratamentos para a primeira inseminação.....	198
Análise 138	Comparação da motilidade espermática entre os diluidores para a primeira inseminação.....	198
Análise 139	Comparação da motilidade espermática entre as frações do ejaculado para a primeira inseminação.....	198
Análise 140	Comparação do vigor espermático entre tratamentos para a primeira inseminação.....	199
Análise 141	Comparação do vigor espermático entre as frações do ejaculado para a primeira inseminação (Teste t).....	199
Análise 142	Comparação vigor espermático entre os diluidores para a primeira inseminação (Teste t).....	199
<b>IIe</b>	<b>Análises estatísticas referentes à tabela 31.....</b>	<b>199</b>
Análise 143	Comparação da motilidade espermática (arcsen $\sqrt{\%}$ ) entre os tratamentos para a segunda inseminação.....	199
Análise 144	Comparação da motilidade espermática entre as frações do ejaculado para a segunda inseminação (Teste t).....	199
Análise 145	Comparação da motilidade espermática entre os diluidores para a segunda inseminação (Teste t).....	199
Análise 146	Comparação do vigor espermático entre os tratamentos para a segunda inseminação.....	199
Análise 147	Comparação do vigor espermático entre as frações do ejaculado para a segunda inseminação.....	200
Análise 148	Comparação do vigor espermático entre os diluidores para a segunda inseminação.....	200
<b>IIf</b>	<b>Análises estatísticas referentes à tabela 32.....</b>	<b>200</b>

<b>Análise 149</b>	Comparação da motilidade espermática (arcsen $\sqrt{\%}$ ) entre os tratamentos para a terceira inseminação.....	200
<b>Análise 150</b>	Comparação da motilidade espermática entre as frações do ejaculado para a terceira inseminação (Teste t).....	200
<b>Análise 151</b>	Comparação da motilidade espermática entre os diluidores para a terceira inseminação (Teste t).....	200
<b>Análise 152</b>	Comparação do vigor espermático entre os tratamentos para a terceira inseminação.....	200
<b>Análise 153</b>	Comparação do vigor espermático entre as frações do ejaculado para a terceira inseminação.....	201
<b>Análise 154</b>	Comparação do vigor espermático entre os diluidores para a terceira inseminação.....	201
<b>IIg</b>	<b>Análises estatísticas referentes à tabela 33.....</b>	201
<b>Análise 155</b>	Comparação da motilidade espermática (arcsen $\sqrt{\%}$ ) entre os tratamentos para a quarta inseminação.....	201
<b>Análise 156</b>	Comparação da motilidade espermática entre as frações do ejaculado para quarta inseminação (Teste t).....	201
<b>Análise 157</b>	Comparação da motilidade espermática entre os diluidores para a quarta inseminação (Teste t).....	201
<b>Análise 158</b>	Comparação do vigor espermático entre os tratamentos para a quarta inseminação.....	201
<b>Análise 159</b>	Comparação do vigor espermático entre as frações do ejaculado para a quarta inseminação.....	202
<b>Análise 160</b>	Comparação do vigor espermático entre os diluidores para a quarta inseminação.....	202
<b>IIIh</b>	<b>Análises estatísticas referentes à tabela 34.....</b>	202
<b>Análise 161</b>	Comparação da ordem de parto das fêmeas distribuídas entre os tratamentos.....	202
<b>Análise 162</b>	Comparação do intervalo desmame-cio das fêmeas entre os tratamentos.....	202
<b>Análise 163</b>	Comparação da duração do cio das fêmeas entre os tratamentos.....	203
<b>Análise 164</b>	Comparação do intervalo do início do cio à primeira inseminação entre os tratamentos.....	203
<b>Análise 165</b>	Comparação do intervalo da colheita do sêmen à primeira inseminação entre os tratamentos.....	203
<b>Análise 166</b>	Comparação da duração da primeira inseminação entre os tratamentos.....	203
<b>Análise 167</b>	Comparação do intervalo do início do cio à segunda inseminação entre os tratamentos.....	203
<b>Análise 168</b>	Comparação do intervalo da colheita do sêmen à segunda inseminação entre os tratamentos.....	203
<b>Análise 169</b>	Comparação da duração da segunda inseminação entre os tratamentos.....	204
<b>Análise 170</b>	Comparação do intervalo entre a primeira e segunda inseminações entre os tratamentos.....	204
<b>Análise 171</b>	Comparação do intervalo do início cio à terceira inseminação entre os tratamentos.....	204
<b>Análise 172</b>	Comparação do intervalo da colheita do sêmen à terceira inseminação entre os tratamentos.....	204
<b>Análise 173</b>	Comparação da duração da terceira inseminação entre os tratamentos.....	205
<b>Análise 174</b>	Comparação do intervalo entre a segunda e terceira inseminações entre os tratamentos.....	205
<b>Análise 175</b>	Comparação do intervalo do início do cio à quarta inseminação entre os tratamentos.....	205
<b>Análise 176</b>	Comparação do intervalo da colheita do sêmen à quarta inseminação entre os tratamentos.....	205
<b>Análise 177</b>	Comparação da duração da quarta inseminação entre os tratamentos.....	205
<b>Análise 178</b>	Comparação do intervalo da terceira e quarta inseminações entre os tratamentos.....	205
<b>Análise 179</b>	Comparação do intervalo da última inseminação ao final do cio entre os tratamentos.....	206
<b>Análise 180</b>	Comparação do número de inseminações realizadas por fêmea/estro dentro de cada tratamento.....	206
<b>IIIi</b>	<b>Análises estatísticas referentes à tabela 35.....</b>	206
<b>Análise 181</b>	Comparação da ordem de parto das fêmeas entre os diluidores, independentemente da fração do ejaculado.....	206
<b>Análise 182</b>	Comparação do intervalo desmame-cio entre os diluidores, independentemente da fração do ejaculado.....	206
<b>Análise 183</b>	Comparação da duração do cio das fêmeas por diluidor, independentemente da fração do ejaculado.....	206

<b>Análise 184</b>	Comparação do intervalo do início cio à primeira inseminação por diluidor, independentemente da fração do ejaculado.....	206
<b>Análise 185</b>	Comparação do intervalo da colheita do sêmen à primeira inseminação por diluidor, independentemente da fração do ejaculado.....	206
<b>Análise 186</b>	Comparação da duração da primeira inseminação por diluidor, independentemente da fração do ejaculado.....	207
<b>Análise 187</b>	Comparação do intervalo do início do cio à segunda inseminação por diluidor, independentemente da fração do ejaculado.....	207
<b>Análise 188</b>	Comparação do intervalo entre a primeira e segunda inseminações por diluidor, independentemente da fração do ejaculado.....	207
<b>Análise 189</b>	Comparação do intervalo do início do cio à terceira inseminação por diluidor, independentemente da fração do ejaculado.....	207
<b>Análise 190</b>	Comparação do intervalo da colheita do sêmen à terceira inseminação por diluidor, independentemente da fração do ejaculado.....	207
<b>Análise 191</b>	Comparação do intervalo entre a segunda e terceira inseminações por diluidor, independentemente da fração do ejaculado.....	207
<b>Análise 192</b>	Comparação do intervalo do início do cio à quarta inseminação por diluidor, independentemente da fração do ejaculado.....	207
<b>Análise 193</b>	Comparação do intervalo da colheita do sêmen à quarta inseminação por diluidor, independentemente da fração do ejaculado.....	208
<b>Análise 194</b>	Comparação da duração da quarta inseminação por diluidor, independentemente da fração do ejaculado.....	208
<b>Análise 195</b>	Comparação do intervalo entre a terceira e quarta inseminações por diluidor, independentemente da fração do ejaculado.....	208
<b>Análise 196</b>	Comparação do intervalo da última inseminação ao final do cio por diluidor, independentemente da fração do ejaculado.....	208
<b>Análise 197</b>	Comparação do número de inseminações em cada fêmea/estro, por diluidor, independentemente da fração do ejaculado.....	208
<b>IIj</b>	<b>Análises estatísticas referentes à tabela 36.....</b>	<b>208</b>
<b>Análise 198</b>	Comparação da ordem de parto das fêmeas por fração do ejaculado, independentemente do diluidor.....	208
<b>Análise 199</b>	Comparação do intervalo desmame-cio por fração, independentemente do diluidor.....	208
<b>Análise 200</b>	Comparação na duração do cio das fêmeas por fração do ejaculado, independentemente do diluidor.....	209
<b>Análise 201</b>	Comparação do intervalo do início do cio à primeira inseminação por fração do ejaculado, independentemente do diluidor.....	209
<b>Análise 202</b>	Comparação do intervalo da colheita do sêmen à primeira inseminação por fração do ejaculado, independentemente do diluidor.....	209
<b>Análise 203</b>	Comparação da duração da primeira inseminação por fração do ejaculado, independentemente do diluidor.....	209
<b>Análise 204</b>	Comparação do intervalo do início do cio à segunda inseminação por fração do ejaculado, independentemente do diluidor.....	209
<b>Análise 205</b>	Comparação do intervalo entre a primeira e segunda inseminações por fração do ejaculado, independentemente do diluidor.....	209
<b>Análise 206</b>	Comparação do intervalo do início do cio à terceira inseminação por fração do ejaculado, independentemente do diluidor.....	209
<b>Análise 207</b>	Comparação do intervalo da colheita do sêmen à terceira inseminação por fração do ejaculado, independentemente do diluidor.....	210
<b>Análise 208</b>	Comparação do intervalo entre a segunda e terceira inseminações por fração do ejaculado, independentemente do diluidor.....	210
<b>Análise 209</b>	Comparação do intervalo do início do cio à quarta inseminação por fração do ejaculado, independentemente do diluidor.....	210
<b>Análise 210</b>	Comparação do intervalo da colheita do sêmen à quarta inseminação por fração do ejaculado, independentemente do diluidor.....	210
<b>Análise 211</b>	Comparação da duração da quarta inseminação por fração do ejaculado, independentemente do diluidor.....	210
<b>Análise 212</b>	Comparação do intervalo entre a terceira e quarta inseminação por fração do ejaculado, independentemente do diluidor.....	210
<b>Análise 213</b>	Comparação do intervalo da última inseminação ao final do cio por fração do ejaculado, independentemente do diluidor.....	211

<b>Análise 214</b>	Comparação do número de inseminações por fêmea/estro por fração do ejaculado, independentemente do diluidor.....	211
<b>III</b>	<b>Análises estatísticas referentes à tabela 37.....</b>	<b>211</b>
<b>Análise 215</b>	Comparação do intervalo da colheita do sêmen à segunda inseminação entre os tratamentos.....	211
<b>Análise 216</b>	Comparação da duração da segunda inseminação entre os tratamentos.....	211
<b>Análise 217</b>	Comparação da duração da terceira inseminação entre os tratamentos.....	212
<b>IIIm</b>	<b>Análises estatísticas referentes à tabela 38.....</b>	<b>212</b>
<b>Análise 218</b>	Comparação do período de manifestação do cio das porcas ao longo do dia, por tratamento.....	212
<b>IIIn</b>	<b>Análises estatísticas referentes à tabela 39.....</b>	<b>212</b>
<b>Análise 219</b>	Comparação da distribuição do número de inseminações realizadas por fêmea e por tratamento.....	212
<b>IIo</b>	<b>Análises estatísticas referentes à tabela 41.....</b>	<b>213</b>
<b>Análise 220</b>	Comparação da ordem de parto das fêmeas utilizadas, entre os tratamentos.....	213
<b>Análise 221</b>	Comparação das taxas de gestação entre os tratamentos.....	213
<b>Análise 222</b>	Comparação do número de leitões nascidos totais entre os tratamentos.....	213
<b>Análise 223</b>	Comparação do número de leitões nascidos vivos entre os tratamentos.....	213
<b>Análise 224</b>	Comparação do número de leitões natimortos entre os tratamentos.....	213
<b>Análise 225</b>	Comparação do número de leitões mumificados entre os tratamentos.....	213
<b>IIp</b>	<b>Análises estatísticas referentes à tabela 42.....</b>	<b>214</b>
<b>Análise 226</b>	Comparação da ordem de parto das fêmeas utilizadas, entre as frações do ejaculado, independentemente do diluidor (Teste t).....	214
<b>Análise 227</b>	Comparação das taxas de gestação entre as frações do ejaculado, independentemente do diluidor.....	214
<b>Análise 228</b>	Comparação do número de leitões nascidos totais, entre as frações do ejaculado, independentemente do diluidor (Teste t).....	214
<b>Análise 229</b>	Comparação do número de leitões nascidos vivos, entre as frações do ejaculado, independentemente do diluidor (Teste t).....	214
<b>Análise 230</b>	Comparação do número de leitões natimortos, entre as frações do ejaculado, independentemente do diluidor (Teste t).....	214
<b>Análise 231</b>	Comparação do número de leitões mumificados, entre as frações do ejaculado, independentemente do diluidor (Teste t).....	214
<b>IIq</b>	<b>Análises estatísticas referentes à tabela 43.....</b>	<b>214</b>
<b>Análise 232</b>	Comparação da ordem de parto das fêmeas utilizadas, entre os diluidores, independentemente da fração do ejaculado (Teste t).....	214
<b>Análise 233</b>	Comparação das taxas de gestação entre os diluidores, independentemente da fração do ejaculado.....	215
<b>Análise 234</b>	Comparação do número de leitões nascidos totais, entre os diluidores, independentemente da fração do ejaculado (Teste t).....	215
<b>Análise 235</b>	Comparação do número de leitões nascidos vivos, entre os diluidores, independentemente da fração do ejaculado (Teste t).....	215
<b>Análise 236</b>	Comparação do número de natimortos, entre os diluidores, independentemente da fração do ejaculado (Teste t).....	215
<b>Análise 237</b>	Comparação do número de mumificados, entre os diluidores, independentemente da fração do ejaculado (Teste t).....	215
<b>III</b>	<b>Análises estatísticas referentes à tabela 44.....</b>	<b>215</b>
<b>Análise 238</b>	Comparação do volume do ejaculado entre as frações 1 e 2.....	215
<b>Análise 239</b>	Comparação da motilidade espermática no sêmen fresco entre as frações 1 e 2 (arcsen $\sqrt{\%}$ ).....	215
<b>Análise 240</b>	Comparação do vigor espermático no sêmen fresco entre as frações 1 e 2.....	216
<b>Análise 241</b>	Comparação da concentração espermática por mL entre as frações 1 e 2.....	216
<b>Análise 242</b>	Comparação do número de espermatozoides móveis/mL entre as frações 1 e 2.....	216
<b>Análise 243</b>	Comparação do número de espermatozoides totais entre as frações 1 e 2.....	216
<b>Análise 244</b>	Comparação do número total de espermatozoides móveis entre as frações 1 e 2.....	216

<b>Análise 245</b>	Comparação do volume de sêmen utilizado por dose inseminante, entre as frações 1 e 2.....	216
<b>Análise 246</b>	Comparação do volume de diluidor utilizado por dose inseminante entre as frações 1 e 2.....	216
<b>Análise 247</b>	Comparação do número potencial de fêmeas inseminadas entre as frações 1 e 2.....	216
<b>Análise 248</b>	Comparação do tempo da colheita do sêmen à diluição entre as frações 1 e 2.....	217
<b>Análise 249</b>	Comparação do tempo da colheita do sêmen ao resfriamento entre as frações 1 e 2.....	217

---

## RESUMO

Avaliou-se em dois experimentos o efeito de duas frações do ejaculado de cinco varrões, a saber a primeira porção (15 ml) da fração rica (F1) e o restante do ejaculado (F2) submetidas a dois métodos de conservação do sêmen (diluição nos diluidores MR-A – T1 ou de glicina-gema de ovo - GGO – T2 e conservação a 17 ou 5°C, respectivamente), sobre as características físicas e morfológicas do sêmen estocado em contêiner especial, em diferentes períodos de tempo (experimento I) bem como sobre a fertilidade e prolificidade de fêmeas suínas (experimento II). Desta forma, utilizou-se em ambos os experimentos a coleta fracionada, sendo o sêmen distribuído em quatro tratamentos: F1T1: sêmen oriundo da F1, diluído no diluidor MR-A e resfriado à 17°C; F1T2: sêmen oriundo da F1, diluído no diluidor GGO e resfriado a 5°C; F2T1: sêmen oriundo da F2, diluído no diluidor MR-A e resfriado a 17°C; F2T2: sêmen oriundo da F2, diluído no diluidor GGO e resfriado a 5°C. No experimento I, as doses inseminantes, contendo  $3 \times 10^9$  de espermatozóides móveis, pertencentes a cada tratamento, foram avaliadas no que se refere à motilidade, vigor e morfologia espermáticas no sêmen a fresco, imediatamente após diluição, e às 12, 24, 36, 48 e 72 horas de estocagem. No Experimento II, 40 porcas da linhagem DB25<sup>®</sup> foram distribuídas uniformemente em quatro tratamentos, como descrito anteriormente. Todos os tratamentos mantiveram uma motilidade aceitável, superior a 50%, nas primeiras 24 horas de armazenamento, independentemente da fração do ejaculado e do método de conservação empregado. Com exceção do tratamento F2T2, que manteve uma motilidade similar ( $p > 0,05$ ) ao longo de todo período de resfriamento (72 horas), sendo inclusive superior aos demais neste período, os outros três tratamentos apresentaram uma redução da motilidade em decorrência do tempo, notadamente após as 24 horas de armazenamento. Com relação às características morfológicas do sêmen, não observou-se diferenças ( $p > 0,05$ ) quanto às percentagens de espermatozóides normais entre as duas frações do ejaculado a fresco. Além disso, todos os tratamentos mantiveram-se dentro dos limites aceitáveis de anormalidades espermáticas, independentemente do tempo de armazenamento. De maneira geral, o diluidor GGO proporcionou maior proteção aos espermatozóides que o diluidor MR-A, embora estas diferenças não tenham sido significativas em todos os tempos avaliados. Entretanto, o método de conservação do sêmen, associado à diluição em diluidor GGO e resfriamento à temperatura de 5°C resultou em maior percentagem ( $p < 0,05$ ) de lesões acrossômicas quando comparado ao utilizando o diluidor MR-A e resfriado a 17°C. Observou-se, ainda, maior presença de gotas citoplasmáticas distais nos espermatozóides na fração 1 ( $p < 0,05$ ). No Experimento II, não observou-se influência ( $p > 0,05$ ) dos tratamentos sobre as taxas de concepção, que foram de 100% para os tratamentos F1T1, F1T2 e F2T1 e de 80% para o tratamento F2T2. Com relação às características das leitegadas, obteve-se médias de nascidos totais de  $16,30 \pm 1,21$ ,  $12,80 \pm 1,21$ ,  $14,90 \pm 1,21$  e  $14,13 \pm 1,35$  leitões para os tratamentos F1T1, F1T2, F2T1 e F2T2, respectivamente, que também não diferiram ( $p > 0,05$ ) entre si. Entretanto, quando comparou-se os efeitos do método de conservação do sêmen, independentemente da fração utilizada, verificou-se superioridade ( $p < 0,05$ ) do método incluindo diluição no diluidor MR-A e manutenção a 17°C, quanto ao número de leitões nascidos vivos, em relação ao método incluindo o diluidor GGO e resfriamento a 5°C, com valores de  $14,25 \pm 0,79$  e  $11,82 \pm 0,73$ , respectivamente. Finalmente, a utilização da F1, através da coleta fracionada do ejaculado, mostrou-se eficiente quanto à manutenção da fertilidade e prolificidade o que possibilitará o surgimento de novas propostas, no que diz respeito ao transporte do sêmen suíno dada a sua alta concentração e baixo volume, enquanto a F2 do ejaculado poderia ser utilizada, eficientemente, dentro da própria granja.

Palavras-chave: suíno, coleta fracionada do ejaculado, sêmen resfriado, inseminação artificial

## ABSTRACT

Two portions of boar ejaculate - first 15ml of the sperm rich fraction (F1) and the rest of the ejaculate (F2) - were collected weekly from 5 mature boars and distributed in four treatments: F1T1 - spermatozoa from F1 extended in MR-A and cooled at 17°C; F1T2 - spermatozoa from F1 extended in glycine-egg yolk (GGO) and cooled at 5°C; F2T1 - spermatozoa from F2 extended in MR-A and cooled at 17°C; and F2T2 - spermatozoa from F2 extended in GGO and cooled at 5°C. All doses were kept in a special container, previously described. In experiment I, spermatozoa motility, vigor, and morphological characteristics of the semen were evaluated immediately after collection, after dilution, and at 12, 24, 36, 48, and 72h of storage. In experiment II, forty DB25<sup>®</sup> breed sows were uniformly distributed among treatment and inseminated with  $3 \times 10^9$  motile spermatozoa from four treatments, as previously described. All treatments kept an acceptable motility, higher than 50% at first 24h of storage, irrespectively of the ejaculate portion and cooling/extender method. The F2T2 kept a similar motility ( $P > 0.05$ ) throughout the cooling time (72h) and was superior in that period, while the others treatments presented a decrease in motility related to time mainly after 24h of storage. There was no difference between the two portions regarding to total number of normal spermatozoa in the fresh semen ( $P > 0.05$ ). Moreover, all treatments showed morphological abnormalities within the acceptable thresholds, irrespectively of the storage time. However, the spermatozoa extended in GGO and cooled at 5°C showed higher percent ( $P < 0.05$ ) of acrosome damage compared to spermatozoa extended in MR-A and cooled at 17°C. Yet, the F1 showed higher number of spermatozoa with distal cytoplasmatic droplets ( $P < 0.05$ ). In experiment II, the influence of treatments on the conception rates was not observed ( $P > 0.05$ ) and they were 100% for F1T1, F1T2, and F2T1 and 80% for F2T2. In relation to litter size, the total born means were  $16.30 \pm 1.21$ ,  $12.80 \pm 1.21$ ,  $14.90 \pm 1.21$ , and  $14.13 \pm 1.35$  piglets for F1T1, F1T2, F2T1, and F2T2, respectively, without significant differences ( $P > 0.05$ ). However, when the effects of cooling methods were compared, irrespectively of the portion, the method using MR-A extender kept at 17°C was superior ( $P < 0.05$ ) regarding the number of live-born piglets ( $14.25 \pm 0.79$ ) in comparison to the GGO extender, kept at 5°C ( $11.82 \pm 0.73$ ). Finally, the use of a special container for boar semen transport in combination with a well-defined portion of the ejaculate, e.g. F1, was proved efficient to maintain sperm viability, sow fertility and prolificity. Further, this methodology will allow the development of new proposals concerning the transportation of swine semen, while the rest of the ejaculate could be used in farm routine to produce conventional liquid semen doses.

Keywords: swine, ejaculate portions, cooled semen, artificial insemination

## 1. INTRODUÇÃO

A reprodução de suínos tem passado, nos últimos anos, por um grande desenvolvimento, notadamente, no que se refere a utilização de técnicas que permitam um melhor controle reprodutivo, diretamente relacionadas à otimização da inseminação artificial (IA) (Levis, 2000). Esta técnica permite a multiplicação exponencial de reprodutores com alto potencial genético, além de ser uma ferramenta fundamental na prevenção de enfermidades suínas oriundas do trânsito e contato entre animais (Phillpott, 1993). De todas as biotecnologias disponíveis é, definitivamente, a melhor alternativa para o controle de todo o processo reprodutivo dentro da granja.

Pesquisas importantes e numerosas têm sido realizadas em todo mundo visando melhorar as técnicas de IA suína, acompanhadas por resultados similares ou superiores aos obtidos com a monta natural (Colenbrander et al., 1993).

A grande difusão da IA, utilizando sêmen resfriado na espécie suína, se deu graças ao desenvolvimento de diluidores que permitem a conservação do sêmen por prolongados períodos de tempo e com fertilidade adequada. Entretanto, a principal limitação observada nesta técnica é a redução da longevidade espermática no decorrer da estocagem, que varia de 1 a 5 dias. De acordo com Gadea (2003) é possível conservar o sêmen resfriado a 15°C por um período de até sete dias, utilizando-se diluidores denominados de longa duração.

Um aspecto crucial nos procedimentos de IA é a necessidade do transporte do sêmen do local de coleta e processamento até o local onde as fêmeas estão alojadas. Esse transporte poderia levar mais de 24 horas, em se tratando de locais de difícil acesso ou

em países de grande extensão territorial, como o Brasil. Dessa forma, o sêmen deveria ser coletado, processado, transportado e estocado de maneira a não afetar adversamente o potencial fertilizante dos espermatozóides. Em suínos, há duas maneiras de preservar o sêmen para o transporte, sendo o resfriamento, normalmente à 15-18°C, a de escolha preferencial ou a criopreservação.

Entretanto, a utilização do sêmen suíno criopreservado, ao contrário do que se observa na espécie bovina, ainda apresenta resultados de fertilidade insatisfatórios, em decorrência da redução da integridade das membranas espermáticas durante o congelamento/descongelamento, resultando em lesões irreversíveis das células e queda da capacidade fertilizante dos espermatozóides. Conseqüentemente, o sêmen diluído e resfriado tem sido amplamente utilizado para a inseminação em todo o mundo, no dia da coleta ou no dia seguinte. Desta forma, o desenvolvimento de novas técnicas de armazenamento e transporte do sêmen a 15 ou 5°C é uma das principais expectativas futuras em relação ao uso da IA em suínos.

Contudo, nos últimos anos, têm havido grandes avanços no desenvolvimento e aplicação de novas biotecnologias envolvendo a reprodução animal. No caso da espécie suína, merecem ser enfatizadas as biotecnologias ligadas às células espermáticas, tais como a criopreservação, a sexagem dos espermatozóides, a fecundação *in vitro*, etc, tanto em termos científicos, quanto econômicos.

Entretanto, deve-se salientar que apesar dos avanços alcançados nesse contexto, a aplicação prática de algumas dessas biotecnologias é limitada pela baixa eficiência que apresentam atualmente, sendo restritas apenas para uso experimental.

Recentemente, tem-se dado muito importância aos componentes do plasma seminal do varrão, especialmente as proteínas, que podem influenciar nos resultados das várias biotecnologias reprodutivas citadas anteriormente. Neste sentido, há grandes diferenças quanto ao efeito do plasma seminal sobre os espermatozoides. Assim, efeitos benéficos ou prejudiciais exercidos pelo plasma seminal podem estar relacionados às variações na composição e concentração de certas proteínas em machos de diferentes espécies, indivíduos de uma mesma espécie, ejaculados de um mesmo macho, e inclusive entre as frações de um mesmo ejaculado (Caballero et al., 2004).

Neste sentido, Peña et al. (2003) citam que os espermatozoides oriundos dos primeiros 10 mL da fração rica de varrões, resistem melhor aos procedimentos de diluição, congelamento/descongelamento do que aqueles contidos na porção final do ejaculado fracionado (segunda porção da fração rica e fração pós-espermática). Da mesma maneira, Rodríguez-Martínez et al. (2005) confirmam que os espermatozoides oriundos dessa primeira fração rica do ejaculado (10 mL) resistem melhor às manipulações no laboratório, tais como estocagem à temperatura ambiente, resfriamento e congelamento/descongelamento do que os espermatozoides do restante do ejaculado, avaliados através da motilidade e integridade das membranas espermáticas.

Pretendeu-se com os experimentos a seguir, avaliar o efeito de duas frações do ejaculado, denominadas de fração 1 (primeiros 15 ml do ejaculado) e fração 2 (restante do ejaculado) sobre diferentes aspectos do sêmen armazenado *in vitro* e a fertilidade de fêmeas suínas inseminadas. Em um primeiro experimento avaliou-se a manutenção das características físicas e morfológicas do sêmen, oriundo das duas frações do ejaculado nos intervalos de 0,

12, 24, 36, 48 e 72 horas após a coleta. No experimento II, avaliou-se a fertilidade de fêmeas inseminadas com doses inseminantes preparadas a partir das duas frações do ejaculado. Em ambos os experimentos, as duas frações foram diluídas nos diluidores MR-A ou glicina-gema de ovo e armazenadas a 17 ou 5°C, respectivamente, em contêiner especial.

## 2. Revisão de Literatura

### 2.1 Frações do ejaculado do varrão

Em suínos, as primeiras ejaculações ocorrem ao início da puberdade, entre cinco e seis meses de idade, sendo os machos considerados pós-púberes de oito a 12 meses, e como adultos, a partir de um ano de idade (Córdova-Izquierdo et al., 2004).

Três frações podem ser distinguidas no ejaculado do varrão, resultantes da atividade testicular e epididimária, assim como de diferentes secreções oriundas das glândulas sexuais acessórias (Garner e Hafez, 1996; Córdova-Izquierdo et al., 2004; Peña et al., 2006), como descrito a seguir: 1-Fração pré-espermática, formada por secreções oriundas da próstata, glândulas vesiculares e glândulas bulbouretrais, com volume de cerca de 10-15 mL. Ela não contém espermatozoides e apresenta, normalmente, aparência clara ou transparente; 2-Fração rica em espermatozoides, com volume variando de 70 a 100 mL e assim, apresentando coloração de aspecto branco-leitoso. Essa fração apresenta alta concentração espermática, variando de 0,5 a  $1 \times 10^9$  de espermatozoides/mL e contém secreções produzidas pela próstata e glândulas vesiculares; 3-Fração pós-espermática, com volume variando de 150-200 mL e poucos espermatozoides. Apresenta aspecto soroso e concentração menor que  $1 \times 10^6$  de espermatozoides/mL. Além disso, uma secreção de consistência gelatinosa oriunda

das glândulas bulbouretrais é encontrada nessa fração. Outra característica da mesma é a presença de grande quantidade de plasma seminal.

Considerando-se que a percentagem de espermatozóides viáveis é um fator importante para o sucesso da fertilização, o ejaculado suíno contém cerca de 65% a 85% de espermatozóides em condição de fertilização (Bonet et al., 1995; Pinart et al., 1999). Sendo assim, o exame do sêmen é uma importante ferramenta para estimar a capacidade fertilizante de um ejaculado. Embora vários parâmetros possam ser investigados, a real capacidade fecundante dos espermatozóides quando alcançam o local de fertilização é difícil de se avaliar previamente *in vitro*. Entretanto, avaliações morfológicas e de características de motilidade são os testes mais utilizados rotineiramente (Martin-Rillo et al., 1996).

## **2.2. Características físicas e morfológicas do sêmen**

### **2.2.1. Coloração e aspecto do sêmen**

Mesmo que as avaliações microscópicas sejam utilizadas como padrão para aceitar ou rejeitar um ejaculado, é importante não esquecer características óbvias, tais como visuais e olfativas do sêmen. Assim, o ejaculado total do varrão deve apresentar um volume considerável (> 150 mL) e, dependendo da concentração, ser de cor branca leitosa (Rozeboom, 1999). Essa cor pode ser um pouco amarelada, embora apresente, normalmente, uma aparência semelhante à do leite desnatado. Ocasionalmente, pequenas quantidades de sangue, geralmente oriundas da uretra, podem estar presentes no ejaculado, dando ao sêmen um tom rosado. Isso normalmente não reduz a fertilidade ou a viabilidade do ejaculado, embora a presença de uma coloração vermelha, mais escura, associada

a um odor pungente deve ser motivo de descarte do ejaculado (Rozeboom, 1999).

O sêmen não deve ter um odor perceptível, embora quando presente, provavelmente esteja ligado a procedimentos sanitários inadequados durante a coleta. Um odor mais forte no ejaculado, pode refletir a presença de fluidos do prepúcio (urina), que geralmente apresentam grande conteúdo de bactérias e contaminantes. Por isso, os ejaculados devem ser avaliados para se detectar alteração de odores, descartando-os quando necessário (Rozeboom, 1999).

### **2.2.2 Volume de sêmen**

Em termos de volume, o ejaculado varia de 150 a 300 mL (Pinart et al., 1999), estando sujeito à variações em decorrência de características individuais e condições ambientais (Setchell, 1991).

Smital (2009) observou diferenças entre raças quanto ao volume da fração rica dentro do ejaculado, sendo essa diferença de até 95 mL, em média, entre raças. Segundo o autor, o varrão apresenta um volume do ejaculado aceitável após um descanso sexual de três dias, atingindo um volume normal após um intervalo de cinco dias entre coletas.

De acordo com Jankeviciute e Zilinskas (2002), o volume total do ejaculado aumenta com o avançar da idade do varrão, enquanto a concentração diminui.

### **2.2.3 Motilidade e vigor espermáticos**

Convencionalmente, a motilidade espermática é um dos parâmetros mais frequentemente utilizados para avaliar a qualidade de um ejaculado (Flowers, 1997; Rigau et al., 2002). Entretanto, a correlação entre motilidade espermática e potencial de fertilização, mensurada como taxas de

fertilidade ou de não retorno ao estro dentro de 60 dias, é um assunto controverso (Berger et al., 1996; Pérez-Llano et al., 2001).

Entretanto, para outros autores, a motilidade é uma importante característica a ser avaliada, quando se quer prever o potencial de fertilidade de um ejaculado (Holt et al., 1997; Tardif et al., 1999; Gadea, 2005). De acordo com Flowers (1997) os ejaculados que apresentam menos de 60% de espermatozoides móveis são menos férteis quando comparados aos apresentando motilidade acima desses níveis.

A motilidade pode ser avaliada visualmente, sendo uma análise subjetiva, quando sob microscópio óptico se estima a percentagem de espermatozoides móveis (Shipley, 1999), ou utilizando-se de análises computadorizadas, nas quais utilizam-se imagens digitais e que permitem ser avaliadas diferentes características, mais objetivamente, mas associada a um custo mais elevado (Verstegen et al, 2002).

No entanto, a motilidade espermática é uma medida subjetiva que depende do observador. Obviamente, a precisão com que as estimativas da motilidade espermáticas são feitas é importante. O coeficiente de correlação é maior quando uma média de várias estimativas subjetivas é utilizada, ao invés de estimativas simples (Foote, 2003), reduzindo assim os erros de amostragem. A análise espermática computadorizada (CASA) tem sido utilizada para resolver este problema, quando observou-se uma correlação significativa com a fertilidade (Holt et al., 1997; Hirai et al., 2001). No entanto, o sistema CASA não está isento de outros erros técnicos e humanos (Holt et al., 1996; Verstegen et al., 2002).

O vigor espermático também é avaliado ao microscópio óptico, no mesmo momento

em que se avalia a motilidade e, corresponde ao tipo de movimento dos espermatozoides, sendo classificado de zero a cinco; o vigor 0 é dado para os espermatozoides sem movimento; 1 para os espermatozoides sem movimento progressivo, com movimentos circulares; 2, espermatozoides com movimentos anormais e alguns progressivos; 3, para os espermatozoides com movimentos progressivos lentos e sinuosos; 4, para os espermatozoides com movimentos progressivos rápidos e 5, para os espermatozoides com movimentos progressivos muito rápidos.

#### **2.2.4 Aglutinação espermática**

A aglutinação espermática é observada quando o espermatozoide se liga a outro espermatozoide pela cabeça ou cauda. Em condições normais, a aglutinação não deveria ocorrer, sugerindo-se uma causa imunológica de infertilidade quando frequentemente presente. Entretanto, sabe-se que um longo tempo de armazenagem do sêmen, induz a aglutinação espermática (Yeste et al., 2008a).

Vale salientar, a inexistência de trabalhos refinados envolvendo um efeito significativo da aglutinação espermática sobre a fertilidade. No entanto, estas células são muitas vezes, espermatozoides sem movimento que podem ter sofrido qualquer dano durante o trânsito através do testículo ou após a ejaculação (Rozeboom, 1999). Segundo o autor, outras possíveis causas de aglutinação espermática incluem variações da temperatura durante o armazenamento e contaminação bacteriana.

É importante considerar o grau de aglutinação espermática quando calcula-se

a concentração de um ejaculado, pois os espermatozoides aglutinados geralmente se dissociam após a diluição do sêmen, antes da mensuração da concentração; com isso,

o número de espermatozoides viáveis nas doses inseminantes pode ser subestimado (Rozeboom, 1999). Considerando-se que não há evidências de que essas células aglutinadas se dissociem após a inseminação, ajustes na contagem total dos espermatozoides presentes em um ejaculado, devem ser baseados no grau de aglutinação visualizado no mesmo.

### 2.2.5 Concentração espermática

A concentração e motilidade espermáticas são talvez as avaliações mais freqüentemente realizadas antes do processamento de um ejaculado, pois demandam pouco tempo e são imprescindíveis para o cálculo do número de doses a serem produzidas por ejaculado. A avaliação da concentração espermática ou do número total de espermatozoides não é um componente de avaliação qualitativa do sêmen. No entanto, mais do que isso, é uma ferramenta para monitorar a saúde e o potencial produtivo do varrão, além de ser a principal característica a ser avaliada no processamento do ejaculado, visando-se otimizar o potencial genético de um indivíduo (Rozeboom, 1999).

O número de espermatozoides por dose inseminante é um importante fator a ser considerado no processo de fertilização. Por outro lado, as centrais de IA tendem a diluir ao máximo o ejaculado visando maximizar a produção de doses. Variações quanto ao número de espermatozoides em um ejaculado tem sido descritas entre diferentes raças de suínos (Kommissrud et al., 2002), sendo o fator maior a influenciar o potencial de produção de doses inseminantes. Além da variação entre raças, Johnson et al. (2000) também cita a importância das variações dentro de cada raça.

Dentro deste contexto, Smital (2009) comparando o registro de 230.705 coletas de sêmen de 2.712 varrões oriundos de sete

diferentes raças e de cruzamentos entre elas, observou uma diferença significativa na produção espermática entre raças. As médias do número total de espermatozoides/ejaculado variou de  $92 \times 10^9$  até  $116 \times 10^9$  de espermatozoides por ejaculado entre as raças. Ainda de acordo com o autor, a produção espermática aumentou rapidamente acompanhando a idade do varrão durante os três primeiros anos, atingindo o valor máximo aos 3,5 anos, e declinando posteriormente. No mesmo trabalho, o autor demonstra que as características seminais estão relacionadas com a intensidade sexual do varrão, sendo que a concentração e o número de espermatozoides totais no ejaculado foi restabelecido após 5-7 dias de descanso, após a última coleta; contudo, o completo restabelecimento da concentração espermática no ejaculado só foi alcançado após um repouso sexual de 10-11 dias.

### 2.2.6 Morfologia espermática

Na avaliação morfológica, as alterações espermáticas são avaliadas e registradas em cada estrutura, separadamente. Os defeitos podem ocorrer em um ou mais segmentos da célula espermática, simultaneamente. Quando a célula apresenta mais de um defeito em regiões distintas, apenas o mais severo é considerado. Ao final, é feita a soma das alterações observadas, não devendo o total obtido ultrapassar o limite aceitável (Furtado et al., 2006).

As anormalidades morfológicas, podem ser um indicador de aberrações na espermatogênese. Algumas anormalidades comprometem a função das células e não podem ser compensadas, levando assim, ao descarte do reprodutor. Anormalidades de forma na cabeça, que carrega o material genético, ou na bainha mitocondrial, que exerce importante controle da função flagelar, são denominadas anormalidades primárias. As anormalidades restantes do

citoplasma, gotas distais ou proximais, e pequenas anormalidades da cauda são definidas como secundárias, e podem ser compensadas pelo aumento da concentração da dose inseminante (Donadeu, 2004).

Em relação às anormalidades espermáticas, podem ser encontradas na literatura várias classificações no que se diz respeito a sua origem e gravidade das alterações. Nesse sentido, pode-se classificar os defeitos espermáticos como de origem primária ou secundária. Aqueles que ocorrem durante a espermatogênese são considerados primários, sendo os desenvolvidos após a espermição considerados secundários. Deve-se enfatizar que os defeitos primários são considerados mais adversos à fertilidade que os secundários (Barth e Oko, 1989).

De acordo com Blom (1983) os defeitos espermáticos também podem ser classificados como maiores ou menores. Nesse sistema, leva-se em consideração o grau de adversidade à fertilidade do macho proporcionado pela alteração, de forma que os defeitos maiores são considerados aqueles comprovadamente associados a prejuízos na fertilidade, enquanto os menores apresentam menor consequência para o potencial fertilizante do macho.

Outra metodologia classifica os defeitos espermáticos como compensáveis e não compensáveis. Os espermatozoides anormais podem reduzir a fertilidade de duas maneiras, ou seja, não atingindo o local de fertilização, ou sendo incompetentes no processo de fertilização dos oócitos e na manutenção do desenvolvimento embrionário inicial (Saacke et al., 2000; Saacke, 2008). No primeiro caso, os defeitos que podem prejudicar a motilidade espermática ou o trânsito dos espermatozoides através do sistema genital da fêmea são classificados como compensáveis; assim, considera-se que um aumento no número de

espermatozoides funcionalmente competentes solucionaria ou atenuaria o problema. Contudo, os defeitos espermáticos associados à falhas de fertilização ou perda embrionária precoce são denominados não compensáveis. Teoricamente, não haveria uma resposta positiva na fertilidade associada a um aumento do número de espermatozoides inseminados (Saacke et al., 2000; Saacke, 2008).

A avaliação das características morfológicas dos espermatozoides apresenta-se como uma das principais formas de se analisar a qualidade seminal. Para vários pesquisadores, a morfologia espermática é um bom parâmetro para prever a sua habilidade fecundante (Kruger et al., 1986; Jouannet et al., 1988; Oehninger et al., 1988; Rigau et al., 2002; Alm et al., 2006; Saacke, 2008). Além da morfologia normal da célula espermática estar correlacionada com a fertilidade, Xu et al. (1998) demonstraram ser este parâmetro responsável por grande parte da variação no tamanho da leitegada, em um rebanho comercial ( $R^2 = 0.59$ ), de forma que esta avaliação deveria ser realizada rotineiramente nas centrais de IA de suínos.

As percentagens de espermatozoides maduros, imaturos e anormais podem ser determinadas pela avaliação microscópica. Assim, um limiar de 75-80% de espermatozoides maduros tem sido considerado um valor ideal (Bonet et al., 1995; Pinart et al., 1998). Quando a percentagem de espermatozoides imaturos for superior a 30%, uma disfunção epididimária pode estar presente, em virtude, principalmente, da ausência de maturação e velocidade do trânsito espermáticos ao longo do epidídimo (Bonet et al., 1995). Em termos de má formação estrutural dos espermatozoides, a cabeça e a cauda são diferentes. Assim, as alterações de cabeça podem ser de número (duas ou mais cabeças), forma (triangular, ovóide,

forma de pêra) ou tamanho (micro ou macro cefálico), enquanto as alterações de cauda podem ser de número (duas ou três), comprimento ou trajetória (dobrada ou enrolada).

O defeito espermático que mais frequentemente reduz a qualidade do ejaculado suíno é o excesso de gotas citoplasmáticas, as quais podem apresentar-se associadas a defeitos funcionais ou estruturais da membrana, reduzindo a sua capacidade fecundante (Johnson et al., 2000; Franco et al., 2009). Estudos têm demonstrado uma correlação negativa significativa entre a percentagem de espermatozoides com gotas citoplasmáticas e a taxa de parto e número de leitões nascidos vivos (Zeuner, 1992). Nesse sentido, Petrunkina et al. (2001) demonstraram que a retenção da gota citoplasmática (sem citar a sua posição) prejudica a ligação do espermatozoide ao epitélio uterino.

Segundo Kuster et al. (2004) a gota citoplasmática possui uma atividade enzimática hidrolítica, que associada a fatores que alteram o processo de maturação espermática, pode estar relacionada à debilidade estrutural da membrana do espermatozoide onde elas se encontram. Sendo assim, o aumento da fragilidade neste local, possibilitaria o giro simples ou o enrolamento do flagelo espermático (Yeung et al., 1999; Cooper e Yeung, 2003).

As gotas podem ser encontradas em todos os ejaculados, estando presentes em maior número na fração inicial (Furtado et al., 2006). Embora a incidência de gotas proximais em suínos seja relativamente baixa, a fertilidade mensurada pela taxa de parto e tamanho da leitegada diminui gradativamente, diante do aumento da sua prevalência (Rozeboom, 2000). O mesmo efeito parece ser verdadeiro, se não ainda

mais grave para as gotas distais; infelizmente, estas são mais comumente encontradas que as gotas proximais (Rozeboom, 2000).

Vale ressaltar, que em machos jovens a presença de gotas proximais é considerada normal, tendendo a desaparecer quando o reprodutor atinge a estabilidade na produção espermática, aproximadamente aos 12 meses de idade (Furtado et al., 2006). Contudo, a retenção de gotas proximais em reprodutores mais velhos pode ser um indício de falhas na maturação epididimária normal (Cooper, 2005).

De acordo com Kato et al. (1996), 97 e 93% dos espermatozoides do varrão oriundos da cauda do epidídimo e ducto deferente, respectivamente, apresentam gotas distais. Os espermatozoides perdem as gotas dentro de um minuto após a ejaculação, sendo que muitas dessas gotas livres, desintegram dentro de poucos minutos após a sua ocorrência.

Visando estudar o efeito da alta frequência de coletas sobre a ocorrência de gotas citoplasmáticas, Pruneda et al. (2005) separaram seis machos sexualmente maduros em dois grupos. Durante quatro dias, um grupo foi submetido a uma alta frequência de coletas de sêmen, correspondendo a duas coletas por dia, a intervalos de 12 horas (grupo estressado), enquanto o outro foi submetido a uma coleta a cada dois dias (grupo controle). Os autores subdividiram o epidídimo em seis regiões distintas (região proximal e distal da cabeça, região proximal e distal do corpo e região proximal e distal da cauda) visando identificar diferenças entre elas quanto à presença de gotas citoplasmáticas proximal, intermediária e distal. No grupo controle, a maioria dos espermatozoides encontrados na região proximal da cabeça do epidídimo apresentaram gota proximal (90%), apenas 0,5% apresentavam gota intermediária

enquanto nenhuma gota distal foi observada. Por outro lado, a frequência de espermatozóides apresentando gota proximal, na região distal da cabeça, reduziu para 18%, enquanto a frequência de gotas intermediária e distal aumentou para 50% e 20%, respectivamente. A incidência de espermatozóides apresentando gota proximal e intermediária, na região proximal do corpo do epidídimo, nesse grupo, aproximou-se de 0%, enquanto a frequência de espermatozóides com gota distal atingiu 75%. A frequência de espermatozóides com gota distal não mudou nas regiões distal do corpo ou proximal e distal da cauda, embora reduzisse para 5% no ejaculado.

Verificaram ainda, que a frequência de espermatozóides apresentando gota proximal e intermediária na região distal da cauda do epidídimo e no ejaculado, no grupo estressado, superou em 40% a

encontrada no grupo controle. Assim, concluiu-se que a alta frequência de coletas resultou em anomalias na migração das gotas proximais presentes nos espermatozóides de varrões.

A percentagem de gotas citoplasmáticas nos ejaculados do varrão não deveria exceder 15%, especialmente quando o sêmen a ser utilizado é armazenado (Rozeboom, 2000). As percentagens máximas de anormalidades primária e secundária não deveriam ultrapassar 10% e 20%, respectivamente (Waberski et al., 1994a; Flowers, 1997). Além disso, a percentagem de espermatozóides morfológicamente normais deveria ser de no mínimo 80% (Shipley, 1999; Johnson et al., 2000).

Uma revisão dos critérios a ser utilizados para a avaliação do sêmen suíno está apresentada na tabela 1.

Tabela 1. Critérios básicos para a avaliação do sêmen suíno a ser utilizado na inseminação artificial

Parâmetros espermáticos	Condição mínima (%)			
	Kuster e Althouse, 1999	Martin-Rillo et al., 1996	Shipley, 1999	Britt et al., 1999
<b>Motilidade</b>	>70	60-100	>70	>60
<b>Anormalidades espermáticas</b>	<20		<20	
<b>Acrossomas normais</b>		70-100		
<b>Gota citoplasmática</b>	<15		<15	
<b>Gota proximal</b>		0-20		
<b>Gota distal</b>		0-30		
<b>Cauda enrolada</b>		0-4		
<b>Anormalidades primárias</b>				<10
<b>Anormalidades secundárias</b>				<20

Adaptado de Vyt, 2007

### 2.2.7 Pressão osmótica e pH do sêmen

Osiose é o fenômeno observado quando uma solução é separada de um solvente por uma membrana permeável, e consiste na difusão do solvente de uma concentração menor para uma maior, através desta membrana semipermeável. A pressão osmótica é a pressão aplicada ao

compartimento hiperosmótico para prevenir o movimento do solvente.

As membranas biológicas oferecem diferentes permeabilidades frente a diferentes solutos, sendo, por esta razão, frequentemente classificadas como semipermeáveis, pois permitem que algumas moléculas pequenas passem através delas, embora impeçam que grandes

moléculas façam o mesmo (Sten-Knudsen, 2002).

Em geral, a osmolaridade de uma solução isotônica é similar à do plasma sanguíneo, de aproximadamente 300 mOm kg<sup>-1</sup>. A osmolaridade de uma solução hipotônica é menor que 300 mOm kg<sup>-1</sup>, enquanto a de uma solução hipertônica seja maior que 300 mOm kg<sup>-1</sup> (Schilling e Vengust, 1986).

Um aumento da pressão osmótica de uma solução pode ser acompanhado por uma variação na concentração de íons nessa solução. Em geral, o choque osmótico afeta a difusão de fosfolipídios na dupla camada da membrana do espermatozóide (Christova et al., 2002), enquanto um aumento na pressão osmótica do meio, reduz a motilidade espermática e causa danos ao acrossoma (Liu e Foote, 1998; Chantler e Abraham-Peskir, 2004).

A tolerância osmótica é um dos mecanismos mais importantes envolvendo a resistência espermática à criopreservação (Curry e Watson, 1994), pois os procedimentos de congelamento e descongelamento causam um grande estresse osmótico à célula espermática, que prejudica, potencialmente, a sua função, diminuindo sua chance de sobrevivência (Pukazhenthil et al., 2000).

No sêmen fresco do varrão, o pH varia entre 7,2 e 7,5. Em pH mais baixo, a motilidade e o metabolismo espermáticos são reduzidos gradualmente. A grande quantidade de glicose na maioria dos diluidores de sêmen suíno causa uma considerável redução do pH intracelular para menos de 6,0. Esta acidose intracelular possibilita a sobrevivência das células espermáticas a estocagem por alguns dias (Johnson et al., 2000).

### 2.3 Plasma seminal e seus componentes

O plasma seminal é um fluido muito complexo, caracterizado por grande conteúdo de água, íons inorgânicos, ácido cítrico, açúcares, sais orgânicos, prostaglandinas e um número variado de proteínas que agem como substâncias tampão, de forma a manter a osmolaridade adequada e um pH próximo de sete (7,0). Proporciona também fontes de energia para o metabolismo tanto aeróbico quanto anaeróbico (Mann e Lutwak-Mann, 1981).

O contato dos espermatozoides com as diferentes substâncias que compõem o plasma seminal ocorre de forma sequencial. O trânsito dos espermatozoides através do epidídimo, onde adquirem capacidade fecundante e motilidade, possui uma duração variável dependendo da espécie, sendo no varrão de 9-11 dias (França et al., 2005). No decorrer do trânsito espermático no epidídimo sua membrana plasmática sofre uma grande remodelação, tanto na composição protéica como de fosfolipídios. Desta forma, enquanto a maior parte das proteínas testiculares serão eliminadas ou sofrerão degradação mediante a ação de diversas enzimas proteolíticas, um grande número de novas proteínas secretadas pelo epidídimo (principalmente na região da cabeça e corpo) serão integradas à membrana espermática neste período (Gatti et al., 2004).

Após a ejaculação, os espermatozoides procedentes do epidídimo entram em contato com as diferentes secreções oriundas das glândulas vesiculares, próstata e bulbouretrais. O conjunto de substâncias produzidas por estas glândulas é espécie-específico e altamente variável entre indivíduos da mesma espécie, assim como entre ejaculados de um mesmo indivíduo.

Além disso, podem variar diante de diferentes processos patológicos, estação do ano ou estado fisiológico do animal (Pérez-Pé et al., 2001; Cardozo et al., 2006).

Tem sido observado em várias espécies, incluindo os suínos, que os espermatozoides epididimários são capazes de fertilizar oócitos *in vitro* (Iritani et al., 1978; Nagai et al., 1984). Assim, poder-se-ia assumir que a função do plasma seminal secretado pelas glândulas sexuais acessórias seriam de menor importância. Entretanto, não há dúvidas quanto ao valor do plasma seminal como regulador em todos os processos relacionados aos espermatozoides, assim como no trato genital da fêmea e durante a fecundação. Estas funções se referem principalmente à nutrição, proteção, regulação da motilidade e capacitação espermáticas, bem como o reconhecimento e união entre gametas. De uma maneira mais indireta, vale salientar a sua ação sobre o trato genital da fêmea produzindo um aumento das contrações uterinas, associado a uma modulação da resposta imune e um relaxamento do istmo tubárico (Johnson et al., 2000).

Na espécie suína, o ejaculado está dividido em três frações, que apresentam entre si uma grande heterogeneidade quanto à sua composição e distribuição dos componentes do plasma seminal. Estas frações se caracterizam por apresentar inicialmente (fração pré-espermática), pouco volume, carência de espermatozoides e presença residual de proteínas; uma segunda fração (fração rica) caracterizada por alta concentração espermática e baixa concentração protéica, e finalmente por uma terceira fração (fração pós-espermática) envolvendo um grande volume e alta concentração de proteínas, observando-se que o número de espermatozoides presentes vai diminuindo até praticamente desaparecer (Ghaoui et al., 2004; Rodríguez-Martínez et al., 2005).

As glândulas sexuais acessórias respondem pela produção da maior parte do volume do ejaculado. Dentre os compostos secretados pelas mesmas, encontram-se uma série de componentes minerais como o zinco ( $Zn^{+2}$ ), com propriedades estabilizadoras de macromoléculas e antibacterianas (Strzezek et al., 1987); o íon cálcio ( $Ca^{+2}$ ) que participa dos processos de capacitação espermática e reação acrossômica; os açúcares como frutose, inositol ácido cítrico e ácido ascórbico que proporcionam energia para o metabolismo da célula (Voglmayr e Amann, 1973; Frei et al., 1990); os aminoácidos (ácido glutâmico, carnitina, taurina, hipotaurina) que servem como fonte de energia e de proteção contra substâncias oxigênio reativas, e as enzimas (proteases, acrosina, nucleases, fosfatase ácida e alcalina e superóxido dismutase) que participam da liquefação seminal, penetração do oócito pelo espermatozoide, digestão de espermatozoides mortos e lesados e proteção contra substâncias oxigênio reativas (Zini et al., 1993).

Além dessas substâncias, o plasma seminal nos mamíferos apresenta vesículas membranosas, que diferem em composição e origem (Piehl et al., 2006). Essas organelas chamadas de prostassomas, recentemente caracterizadas em suínos (Piehl et al., 2006), são delimitadas por uma, duas ou múltiplas membranas, apresentando grande quantidade de colesterol e fosfolipídios, com tamanho entre 21 e 100 nm. De acordo com Piehl et al. (2006) os prostassomas são diferentes das gotas citoplasmáticas (2–5  $\mu m$ ), as quais são perdidas da maioria dos espermatozoides durante o trânsito epididimário. El-Hajj Ghaoui et al. (2004), ao estudarem a presença dos prostassomas em suínos, concluíram que essas vesículas membranosas são isoladas principalmente da fração rica do ejaculado, e em menor proporção da fração pós espermática, sugerindo uma origem epididimária e prostática.

A função dos prostassomas tem sido mais estudada em humanos e apresenta controvérsias. De acordo com Arienti et al. (1997) os prostassomas estão relacionados a processos de estabilização de membranas, prevenindo a capacitação e a reação acrossômica espontânea. Entretanto, outros autores mostram que a fusão dos prostassomas com os espermatozóides podem estimular a reação acrossômica tornando as células espermáticas mais sensíveis (Palmerini et al., 2003). Este efeito poderia ser explicado pela transferência de cálcio e enzimas hidrolíticas essenciais para a reação acrossômica durante o processo de fusão (Palmerini et al., 1999; Minelli et al., 2002).

Em suínos, Siciliano et al. (2008) avaliaram pela primeira vez, os efeitos da interação dos prostassomas com os espermatozóides. Os dados apresentados pelos autores demonstram que os prostassomas do sêmen do varrão são capazes de interagir *in vitro* com os espermatozóides, estimulando a reação acrossômica. Assim, os autores reafirmaram a hipótese da ocorrência de uma transferência de substâncias das vesículas para os espermatozóides, aumentando a responsividade da membrana no sentido da reação acrossômica.

Contudo, mesmo considerando-se a importância dos prostassomas, são as proteínas presentes no plasma, as que contribuem de forma mais relevante na regulação da maior parte das funções espermáticas, daí ser objeto de numerosos estudos.

Diferentes estudos envolvendo a influência do plasma seminal sobre a funcionalidade e fertilidade dos espermatozóides apresentam resultados contraditórios. Desta forma, alguns demonstram que a adição de plasma seminal ao meio que contém os espermatozóides pode reduzir a funcionalidade e fertilidade espermáticas

(Dott et al., 1979; Moore et al., 2005; Akcay et al., 2006). Por outro lado, alguns estudos mostram que a adição do plasma seminal em determinadas etapas da manipulação espermática, estabiliza a célula evitando que ocorra o processo de capacitação e melhorando, desta forma, a viabilidade e a sua capacidade fecundante (Maxwell e Johnson, 1999; Barrios et al., 2000; Garner et al.; 2001; Vadnais et al., 2005, 2007).

Tais diferenças poderiam envolver uma variabilidade na proporção de fatores capacitantes e decapitantes presentes no plasma seminal, ou possivelmente, um efeito benéfico ou prejudicial de determinadas proteínas do plasma seminal, bem como a variação que existe na concentração das mesmas entre indivíduos da mesma espécie e inclusive, entre ejaculados do mesmo indivíduo (Caballero et al., 2004; Maxwell et al., 2007).

Na espécie suína, alguns estudos tem demonstrado que o plasma seminal do varrão apresenta um heterodímero protéico, de baixo peso molecular, composto dos monômeros PSP-I e PSP-II que, adicionados aos meios de diluição quando os espermatozóides estão altamente diluídos, produzem *in vitro*, um efeito benéfico sobre a viabilidade, motilidade e atividade mitocondrial dos espermatozóides (Centurión et al., 2003). Este heterodímero pertence à família das espermadesinas, proteínas presentes no plasma seminal, que representam aproximadamente 90% do conteúdo protéico total do plasma seminal do varrão, sendo que o heterodímero PSP-I/PSP-II constitui, aproximadamente, mais de 50% das proteínas totais do plasma seminal (Calvete e Sanz, 2007). A espécie suína é a que apresenta maior diversidade de membros dessa família. Em função de sua capacidade de união à heparina, as espermadesinas são classificadas em proteínas que se unem à heparina (AQN-1,

AQN-3, AWN) e proteínas que não se unem à heparina (heterodímero PSP-I/PSP-II) (Calvete et al., 1995).

As espermedesinas são uma família de glicoproteínas de baixo peso molecular (12-16 kDa) compostas por 109 a 133 aminoácidos, constituídos estruturalmente por um único domínio CUB que serve como suporte estrutural e ao qual se podem atribuir diferentes funções (Romero et al., 1997). As espermedesinas apresentam, ainda, a característica de se unir à superfície da membrana plasmática do espermatozóide durante a ejaculação (Saz et al., 1992; Topfer-Peterson et al., 1998).

### 2.3.1 Espermedesinas e suas funções

A motilidade espermática pode ser influenciada pela variabilidade na composição do plasma, observando-se que a adição de plasma seminal heterólogo pode afetar positiva ou negativamente este parâmetro, dependendo da fonte do plasma seminal. Além das variações entre indivíduos e ejaculados, tem-se demonstrado variações entre frações do plasma seminal dentro de um mesmo ejaculado. Zhu et al. (2000) obtiveram melhor taxa de penetração *in vitro*, quando os espermatozóides foram incubados com plasma seminal oriundo da fração rica do ejaculado. Posteriormente, Peña et al. (2006) observaram diferentes resistências ao processo de criopreservação, dependendo da fração do ejaculado à qual os espermatozóides pertenciam. Ainda de acordo com os mesmos autores, todas as variações poderiam ser explicadas pelas diferenças nos perfis protéicos, característicos das diferentes frações do ejaculado.

Tem-se observado que a incubação dos espermatozóides com o plasma seminal previne o fenômeno de capacitação espermática (Davis e Niwa, 1974; Kanwar

et al., 1979). Além disso, o processo de capacitação espermática é reversível, podendo ser paralisado pelo contato dos espermatozóides com substâncias estabilizadoras presentes no plasma seminal, capazes de mediar o processo de capacitação (Chang, 1957). Estes fatores decapacitantes devem ser eliminados da superfície da membrana plasmática dos espermatozóides para que seja possível o início da capacitação. Segundo Calvete et al. (1996b), alguns destes fatores pertenceriam, provavelmente, à família das espermedesinas.

Após a ejaculação, um espermatozóide apresenta aproximadamente entre 10 e 60 milhões de moléculas de espermedesinas recobrando sua superfície. Entretanto, a maioria destas moléculas são eliminadas após o processo de capacitação *in vitro* (Dostálová et al., 1994). Considerando-se a biossíntese e afinidade das espermedesinas, descreveu-se um modelo no qual os espermatozóides, ainda no epidídimo, apresentariam algumas moléculas de AWN-1 aderidas à sua membrana plasmática, as quais se uniriam, após a ejaculação, moléculas não agregadas de AWN-1 e AQN-3, que finalmente seriam recobertas pelo resto das espermedesinas na forma de agregados (Dostálová et al., 1995). Esta cobertura de espermedesinas teria a função de prevenir reação acrossômica prematura, sendo a mesma liberada após a capacitação (Töpfer-Petersen e Calvete, 1996; Jansen et al., 2001).

Entretanto, esses agregados de espermedesinas apresentam afinidade pelo colesterol, e podem assim, atuar como receptores dessas moléculas quando liberadas dos espermatozóides. A perda de moléculas de colesterol reduz a proporção colesterol/fosfolípídio, um fenômeno associado à capacitação espermática (Jonáková et al., 2000). Além disso, existe uma afinidade de algumas espermedesinas pela heparina e outros glicosaminoglicanos,

os quais promovem a capacitação espermática e estão presentes na tuba uterina da porca (Therien et al., 1995; Therien et al., 1997; Tienthai et al., 2000). Assim, essas espermadésinas estariam envolvidas na regulação da capacitação, apresentando uma dupla função, já que manteriam as células espermáticas estáveis até sua chegada à tuba uterina, onde promoveriam a sua capacitação. Uma função similar é apresentada pelas proteínas do plasma seminal bovino (BSP), as quais se unem aos fosfolipídios da membrana dos espermatozoides após a ejaculação, estabilizando-a. Contudo, quando são expostos à lipoproteínas de alta densidade e glicosaminoglicanos como a heparina, induzem a capacitação (Therien et al., 1997; Manjunath e Therien, 2002).

A identificação de substâncias do plasma seminal que pudessem estar relacionadas a um efeito benéfico sobre os espermatozoides, foi tentada por Caballero et al. (2006). Neste estudo, avaliaram o efeito protetor do heterodímero PSP-I/PSP-II e sua possível relação com a superfície dos espermatozoides do varrão, submetidos à altas diluições. Para isto, os espermatozoides altamente diluídos foram incubados por 10 horas em um meio salino simples (PBS), na presença ou ausência do heterodímero PSP-I/PSP-II, quando avaliou-se a viabilidade e funcionalidade espermáticas, além de se estudar o padrão de união do heterodímero à cabeça do espermatozoide, mediante técnicas imunocitoquímicas. Demonstrou-se que praticamente 100% dos espermatozoides foram imunopositivos após a adição de PSP-I/PSP-II exógeno, localizando-se o heterodímero, principalmente, na região acrossomal da cabeça do espermatozoide. Entretanto, esta união diminuiu ao longo do tempo de incubação. Assim, observou-se uma redução de até 50% na proporção de espermatozoides marcados pelo anticorpo após 10 horas de incubação, enquanto nas

amostras onde adicionou-se PSP-I/PSP-II exógena, aproximadamente 80% dos espermatozoides permaneceram positivos ( $p < 0,05$ ). Estes dados indicam que o heterodímero se une à membrana do espermatozoide antes ou durante a ejaculação, e que essa união é suficientemente forte para que a proteína permaneça unida por várias horas em uma grande percentagem de espermatozoides, inclusive quando submetidos à diluições extremas.

Com respeito a funcionalidade espermática, Caballero et al. (2006) observaram que a mesma percentagem de espermatozoides que apresentava membrana intacta, apresentava também maior atividade mitocondrial, durante todo o processo de incubação; no entanto, a percentagem de espermatozoides móveis foi sempre menor que a de espermatozoides com membrana intacta. As diferenças encontradas nesse estudo entre a motilidade e a atividade mitocondrial, já foram descritas anteriormente, e refletem, provavelmente, diferenças na atividade espermática ou na metodologia empregada (Windsor, 1997; Centurión et al., 2003). Entretanto, hipotetiza-se que a função das mitocôndrias seria fornecer ATP para a cabeça do espermatozoide e peça intermediária por fosforilação oxidativa, visando manter ativos os diferentes gradientes de difusão da membrana plasmática, imprescindíveis à sobrevivência espermática. Dentro desse contexto, o ATP necessário para a motilidade espermática seria produzido mediante a glicólise (produção anaeróbica de ATP) por enzimas localizadas na bainha fibrosa da cauda dos espermatozoides (Silva e Gadella, 2006).

Ao estudarem o efeito *in vitro* das subunidades PSP-I e PSP-II sobre as características funcionais dos espermatozoides altamente diluídos, Garcia et al. (2006) observaram que a sub-unidade

PSP-II parece imitar o efeito descrito para o heterodímero (Centurión et al., 2003) já que mantém a viabilidade, motilidade e atividade mitocondrial dos espermatozoides ao longo do tempo. Assim, ainda que a sub-unidade PSP-I também exerça um efeito protetor sobre a viabilidade e atividade mitocondrial do espermatozoide, esta é de menor intensidade quando comparado ao exercido pela sub-unidade PSP-II. Contudo, deve-se destacar que a sub-unidade PSP-I exerce um efeito prejudicial sobre a motilidade espermática, seguindo um padrão muito similar ao que se observou previamente *in vitro* para as espermadesinas que se unem à heparina (HBPs) (Centurión et al., 2003). Essas proteínas produziram uma clara imobilização de espermatozoides submetidos a altas diluições, quando incubados na presença de HBPs (Centurión et al., 2003). Entretanto, de acordo com Garcia et al. (2006) a observação de que a sub-unidade PSP-I suprime a motilidade espermática, o que não ocorre com o heterodímero total, sugere que esta atividade poderia estar suprimida pela dimerização, produzida quando da união das duas sub-unidades para formar o heterodímero PSP-I/PSP-II.

Alguns estudos têm estabelecido que as HBPs exercam um efeito nocivo sobre a fisiologia espermática *in vitro*. As espermadesinas PSP-I/PSP-II exercem, por outro lado, um efeito contrário. Assim, a reunião de ambos os tipos de espermadesinas provocam efeitos intermediários sobre espermatozoides altamente diluídos (Centurión et al., 2003). Sendo assim, a variabilidade entre as concentrações relativas de ambas as proteínas do plasma seminal poderia responder pelas diferentes respostas dos espermatozoides quando diluídos no plasma seminal, já que são as proteínas mais abundantes no mesmo. Desta forma, Garcia et al. (2009) realizaram coletas do ejaculado total de três varrões, em séries de 50 mL, para estudar como o perfil protéico das

diferentes frações do ejaculado influenciaria os parâmetros seminais de espermatozoides altamente diluídos. Observaram, ainda, a distribuição do heterodímero PSP-I/PSP-II ao longo dessas frações. Verificou-se que a concentração do heterodímero não foi uniforme entre as frações do ejaculado, nem entre as subfrações em que se dividiu a fração pós-espermática, que apresentou a maior proporção da espermadesina PSP-I/PSP-II, além da maior concentração de proteínas totais. Observou-se, ainda, que a fração rica apresentou a menor concentração protéica. Avaliaram, ainda, o efeito do plasma seminal oriundo das diferentes frações sobre os espermatozoides altamente diluídos, mostrando que a adição de 10% do plasma seminal das distintas frações melhorou a viabilidade e motilidade, quando comparados às dos espermatozoides que haviam sido incubados sem adição do plasma seminal. Contudo, a adição do plasma seminal oriundo da fração rica induziu os melhores resultados de motilidade e integridade da membrana, coincidindo com os resultados obtidos anteriormente, por Peña et al. (2006). Deve-se considerar que a presença do heterodímero PSP-I/PSP-II nessa fração foi baixa. Além disso, observou-se grande quantidade do heterodímero na fração pós-espermática; entretanto, o efeito do plasma seminal dessa fração sobre os espermatozoides altamente diluídos não foram tão benéficos quanto o produzido pelo plasma da fração rica. Assim, estas diferenças poderiam estar relacionadas à concentração da PSP-I/PSP-II presente em cada fração. De acordo com Centurión et al. (2003), o efeito protetor que o heterodímero exerce sobre os espermatozoides altamente diluídos está associado a uma concentração específica da espermadesina, de 1,5 mg/mL, ao passo que concentrações superiores a 7,5 mg/mL provocam, aparentemente, o desaparecimento desse efeito.

Ainda que a fração pós-espermática seja a fração que produz os piores resultados

envolvendo a integridade de membrana e motilidade espermáticas quando comparados aos das outras frações, a sub-fração da fração pós-espermática, caracterizada pela predominância do heterodímero, respondem pelos menores danos sobre as células espermáticas (Garcia et al., 2009). Contudo, de acordo com os mesmos autores, o efeito negativo exercido pelo plasma seminal da fração pós-espermática poderia também estar relacionado à presença das proteínas HBPs, já que sua concentração aumenta paralelamente à do heterodímero PSP-I/PSP-II na fração pós-espermática.

Estes resultados são similares aos apresentados por Centurión et al. (2003), quando observou-se que a incubação de espermatozoides do varrão, submetidos a uma alta diluição, na presença de todas as espermedesinas (PSPs e HBPs), produziu uma queda na funcionalidade espermática devido a presença das HBPs.

### **2.3.2 Afinidade das espermedesinas**

As espermedesinas na espécie suína (AQN, AWN e proteínas da família PSP) são secretadas principalmente pelas glândulas vesiculares; entretanto, seus respectivos RNAm tem sido encontrados também na cauda do epidídimo e próstata (Manásková e Jonáková, 2008).

As espermedesinas AQN e AWN mostram afinidade para vários ligantes, tais como fosforilcolina, heparina, ácido hialurônico, manose, epitélio da tuba uterina e glicoproteínas da zona pelúcida do oócito. Essas proteínas se ligam à superfície dos espermatozoides durante a ejaculação, formando uma camada de revestimento e, participam em diferentes tipos de interação nas etapas posteriores do processo reprodutivo (Manásková e Jonáková, 2008). O conhecimento das propriedades ligantes das proteínas as predetermina a

participarem das etapas subsequentes do processo reprodutivo, tais como da formação do reservatório espermático, da capacitação espermática e da ligação à zona pelúcida do oócito (Jonáková et al., 2007). A AQN e AWN são espermedesinas multifuncionais, responsáveis pela ligação com o epitélio da tuba uterina (Liberda et al., 2006), além de possuírem um papel primário na interação dos espermatozoides com a zona pelúcida do oócito (Manásková et al., 2000). Têm sido demonstrada a presença das espermedesinas AQN e AWN na superfície dos espermatozoides do epidídimo e nos do ejaculado; no caso da espermedesina AQN, também tem sido encontrada nos espermatozoides capacitados (Veselský et al., 1999).

De acordo com Manásková e Jonáková (2008), as espermedesinas da família PSP, também podem ser encontradas na superfície dos espermatozoides presentes no epidídimo e no ejaculado. A localização das espermedesinas PSP na superfície dos espermatozoides encontrados no epidídimo, confirma a presença dessas proteínas no fluido epididimário, bem como a sua habilidade de se unir aos espermatozoides durante a maturação no epidídimo. A proteína PSP-I está localizada na região acrossomal e peça intermediária dos espermatozoides encontrados no epidídimo; contudo, a proteína PSP-II está situada no flagelo dos espermatozoides. Já nos espermatozoides presentes no ejaculado, essas espermedesinas encontram-se principalmente na região acrossomal, e mais pobremente na peça intermediária e flagelo dos espermatozoides (Manásková e Jonáková, 2008). De acordo com esses autores, essa diferença na localização das espermedesinas na superfície dos espermatozoides presentes no epidídimo ou no ejaculado, se deve à uma sobreposição das proteínas que cobriam anteriormente os espermatozoides no epidídimo, por outras

proteínas do plasma seminal durante a ejaculação.

De acordo com Strzezek et al (2002) as concentrações de proteínas do plasma seminal em suínos, ficam estabilizadas desde o início da maturidade sexual do varrão até a idade de 2,5 anos, sendo reduzidas, significativamente em varrões a partir dos 3 anos de idade. A alta correlação existente entre a concentração de proteínas do plasma seminal e a habilidade fertilizante dos espermatozoides, tem sido utilizada como critério para prever a fertilidade dos machos (Flowers, 1997; Killian et al., 1993).

## **2.4 Fatores a serem considerados no processo de resfriamento e/ou transporte do sêmen diluído de varrões**

### **2.4.1 Individualidade dos varrões**

Existe uma grande variabilidade entre varrões no que se refere à várias características importantes de produtividade nas centrais de IA. Dentre elas, vale salientar a idade à puberdade, libido e treinabilidade para a coleta, bem como as características de resistência das células espermáticas aos processos de resfriamento e congelamento. Além das diferenças entre indivíduos, observam-se diferenças entre raças, entre varrões de raças puras e cruzados e, finalmente, entre linhas genéticas (Sonderman e Luebbe, 2008).

Normalmente, varrões oriundos do cruzamento de duas ou mais raças produzem maior quantidade e qualidade de sêmen, seguidos por varrões de raças puras de linhagem terminal, e por fim, varrões de raças de linha materna (Sonderman e Luebbe, 2008). De acordo com os autores, as diferenças incluem susceptibilidade à infertilidade sazonal, interações entre volume do ejaculado e idade, frequência de coleta, taxa de descarte de ejaculados, idade

à puberdade, libido, facilidade em condicioná-los para a coleta, e tempo de preservação do sêmen.

Com relação ao libido e idade à puberdade, os machos oriundos das linhas maternas parecem ser aproximadamente dois meses mais tardios quando comparados aos machos de linha terminal (8-9 e 6-7 meses, respectivamente). A treinabilidade, ou seja, condicionamento do macho para saltar sobre o manequim para a coleta, também é favorecida nas linhas terminais, sendo que machos de linha materna necessitam de mais tempo de treinamento, esforço e estímulo visual e competitivo (Sonderman e Luebbe, 2008).

### **2.4.2 Tipo de colheita do sêmen: total ou fracionada**

A maior parte dos espermatozoides ejaculados (80-90%) estão presentes na fração rica do ejaculado, sendo portanto a fração preferencial a ser coletada para o processamento do sêmen visando-se a inseminação artificial. Além disso, o número de espermatozoides liberados nessa fração é desigual, sendo que a maioria dos espermatozoides ejaculados estão presentes nos primeiros 10-15 mL da fração rica (Rodríguez-Martínez et al., 2005). Os autores sugerem que os espermatozoides presentes na primeira porção da fração rica (P1), devem ser considerados, dentre todos os espermatozoides do ejaculado, como aqueles que colonizarão, primariamente, o reservatório espermático na tuba uterina das porcas, e portanto, aqueles que estarão envolvidos, principalmente e potencialmente na fertilização (Rodríguez-Martínez et al., 2005).

Os espermatozoides e plasma seminal depositados e retidos na cavidade uterina, são eliminados tanto por refluxo vaginal (Viring e Einarsson, 1981) como por fagocitose (Rodríguez-Martínez et al.,

1990) através de leucócitos (PMN) que migram do endométrio para o lúmen uterino, e parcialmente, por macrófagos no epitélio endometrial (Rodríguez-Martinez et al., 1990). Os PMN não atingem o lúmen uterino imediatamente após a deposição do sêmen, não pelo menos nos primeiros dez minutos, sendo que a grande presença de PMN é primeiramente detectada 30 minutos após a deposição do sêmen (Lovell e Getty, 1968), aumentando significativamente ao longo de 2-3 horas (Viring e Einarsson, 1981).

Vários fatores tem sido considerados como mediadores do recrutamento dos PMN para o lúmen uterino, incluindo a distensão do útero (Matthijs et al., 2003), a presença dos espermatozoides (Rozeboom et al., 1999), ou plasma seminal (Claus, 1990). O plasma seminal contém tanto fatores estrogênicos como não-estrogênicos que interagem com os espermatozoides e a superfície do útero (Rozeboom et al., 2000). A maioria desses fatores não-estrogênicos são proteínas do plasma seminal, dentre elas o heterodímero PSP-I/PSP-II, que apresentam atividade imuno-estimulatória, como já descrito anteriormente.

Observa-se que a menor concentração do heterodímero PSP-I/PSP-II é encontrada na primeira porção da fração rica do ejaculado (primeiros 10 a 15 mL) em comparação ao restante da fração rica e da fração pós-espermática do ejaculado. Assim, há indícios de que o período de latência até o início da migração de PMN para o lúmen uterino (< 30 min) bem como a presença de diferentes proteínas nas várias frações do plasma seminal, possibilitem um tempo de tolerância para que certas subpopulações de espermatozoides ejaculados atravessem o lúmen uterino até o reservatório espermático, sem risco de serem fagocitados (Rodríguez-Martinez et al., 2005).

Tem sido hipotetizado que uma subpopulação de espermatozoides no ejaculado suíno, coloniza primariamente o reservatório espermático após a cobertura. Rodríguez-Martinez et al. (2005) visando confirmar essa hipótese, realizaram um experimento envolvendo dez porcas multíparas alojadas, no dia do desmame e divididas, após a detecção do estro, em dois grupos: grupo controle ou submetidas ao tratamento e inseminadas artificialmente. Para as inseminações foram utilizadas doses inseminantes oriundas de duas frações do ejaculado, sendo os primeiros 10 mL da fração rica (denominada porção I) e o restante da fração rica e fração pós-espermática (porção II). Após a determinação da concentração espermática e motilidade subjetiva, os espermatozoides da porção I foram marcados com um corante fluorescente (Hoechst 33252), enquanto os espermatozoides da porção II não foram corados. As inseminações foram realizadas através do método convencional, 12 horas após o início do estro, da seguinte forma: Grupo controle, inseminado com uma mistura da Porção I e II em uma única IA (100mL por dose) ou Grupo tratado, quando utilizou-se a Porção I (10 mL), introduzida no útero através de uma seringa conectada à pipeta, e imediatamente, seguida por 80 mL da Porção II.

Posteriormente, as porcas foram eutanasiadas aproximadamente 3 horas após a IA, sendo os órgãos genitais retirados. Os fluidos da cada reservatório espermático foram examinados para concentração espermática e proporção de espermatozoides fluorescentes. Não houve diferenças significativas quanto ao número total de espermatozoides inseminados (22 e 18 bilhões) entre os grupos controle e tratado, respectivamente, nem quanto ao número de espermatozoides inseminados por fração. Entretanto, houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na percentagem de

espermatozoides corados, sendo de  $54,2 \pm 5,66\%$  versus  $37,0 \pm 2,70\%$  para os grupos tratado e controle, respectivamente. Os resultados indicam, que os espermatozoides da primeira porção da fração rica do ejaculado, marcados com o corante fluorescente, compunham a maior parte dos espermatozoides presentes no reservatório espermático, sob as condições experimentais utilizadas, quando a deposição fracionada do sêmen foi mimetizada.

Durante a monta natural, geralmente os espermatozoides são expostos apenas às proteínas da porção inicial da fração rica, sendo que a sua exposição às frações posteriores do ejaculado exercem um efeito prejudicial na qualidade espermática e conseqüentemente na fertilidade (Rodríguez-Martínez et al., 2008).

Novak et al. (2009) realizaram um experimento com o objetivo de avaliar a presença de proteínas específicas do plasma seminal (PSP-I, AWN-1 e Osteopontina) em diferentes frações do ejaculado. Para isso, os ejaculados foram coletados de forma fracionada em tubos de 15 mL como descrito por Xu et al. (1998). Considerou-se como a fração representativa do pico de espermatozoides, o tubo contendo a maior concentração espermática dentre os tubos pertencentes à fração rica do ejaculado (normalmente os primeiros 15 mL da fração coletada). Os tubos que apresentavam concentração espermática  $\geq 100 \times 10^6$  de espermatozoides por mL eram classificados como pertencendo à primeira fração rica do ejaculado. Por outro lado, aqueles contendo menos que  $100 \times 10^6$  de espermatozoides por mL, coletados entre a primeira e a segunda frações ricas, foram considerados como a fração pobre em espermatozoides. Amostras foram retiradas de cada fração (pico de espermatozoides, fração rica e fração pobre em espermatozoides) para avaliação das proteínas do plasma seminal. De acordo com os autores, a fração

representativa do pico de espermatozoides, apresentando a maior concentração espermática, envolveu, normalmente, o primeiro tubo coletado, sendo que os espermatozoides oriundos dessa fração apresentaram maior habilidade fertilizante *in vitro*. Essa fração apresentou, ainda, menor concentração de proteínas totais em relação às outras duas frações avaliadas, além de menores concentrações das proteínas específicas avaliadas, diante da fração pobre em espermatozoides. Segundo os autores, tais diferenças se devem à origem dos componentes do plasma seminal no que diz respeito às glândulas sexuais acessórias e sua contribuição seqüencial de proteínas secretadas no ejaculado. As primeiras secreções presentes no ejaculado são produzidas pela próstata, com a função de limpar o trato genital do macho, seguidas por uma concentração espermática muito alta, nos primeiros 10 a 15 mL da fração rica do ejaculado. Em seguida, o ejaculado torna-se paulatinamente diluído pelo fluido oriundo das vesículas seminais nos próximos 30 a 70 mL, até a fração livre de espermatozoides ser coletada. Dependendo da frequência de coletas, uma segunda fração rica, embora menos concentrada, pode estar presente, até o ejaculado finalizar com a fração gel secretada pelas glândulas bulbouretrais.

De acordo com Manásková et al. (2002), as secreções da próstata contem menores concentrações de proteínas PSP-I e AWN-1 do que o plasma seminal do ejaculado total. Esses resultados concordam com os apresentados por Novak et al. (2009), quando observou-se que a fração representativa do pico de espermatozoides, ou seja, a primeira fração coletada que contém, principalmente, secreções da próstata, apresentaram menores concentrações de PSP-I que a fração rica do ejaculado. Da mesma forma, Rodríguez-Martínez et al. (2008) também relataram maior concentração de proteínas na fração

rica do ejaculado, em relação à fração representativa do pico de espermatozóides.

Outro fator a contribuir para as diferenças observadas no perfil de proteínas, entre as frações do ejaculado, é a variabilidade na concentração espermática. Assim, a alta concentração espermática na fração representativa do pico de espermatozóides, reteria uma grande proporção de proteínas ligadas às suas membranas, de forma a reduzir, em seguida, a quantidade residual de proteínas totais no plasma seminal. Metz et al. (1990) relataram que os espermatozóides epididimários absorvem 14 pg de proteínas/espermatozóide sob um período de 10 minutos, e que 82% das proteínas retidas são de baixo peso molecular. Os autores confirmam ainda, que os espermatozóides de baixa qualidade, apresentando motilidade progressiva de 50 a 30%, absorvem significativamente menos proteínas (3 pg de proteína/espermatozóide em 10 minutos). Essas observações também são consistentes com as de Novak et al. (2009), de que a concentração espermática e a concentração total de proteínas foram negativamente relacionadas na fração espermática rica e na fração representativa do pico de espermatozóides.

Desta forma, uma combinação de três fatores, ou seja, a origem do plasma seminal, a qualidade espermática (capacidade do espermatozóide de absorver proteínas do plasma seminal) e a concentração espermática, coletivamente são responsáveis pelas variações observadas na concentração de proteínas totais, entre as frações do plasma seminal (Novak et al., 2009).

A fração representativa do pico de espermatozóides exibiu efeito positivo na fertilização e respondeu pelas menores concentrações de proteínas totais e PSP-I, sugerindo que a alta concentração de certas proteínas, especialmente as espermadesinas,

tem um efeito negativo na fertilidade *in vivo* (Novak et al., 2009). As proteínas devem ter um importante papel na longevidade espermática como fatores decapacitantes, entretanto, devem também reduzir a fertilidade quando em excesso ou quando os espermatozóides são a elas expostos, por um período prolongado de tempo (Novak et al., 2009).

#### **2.4.2.1 Características físicas do sêmen de varrões submetidos a colheita total ou fracionada e armazenado *in vitro* à diferentes temperaturas e períodos de estocagem**

Vários estudos na espécie suína têm sugerido que os espermatozóides oriundos da fração representativa do pico de espermatozóides (P1), são aqueles que melhor sobrevivem à manipulação, incluindo a criopreservação (Sellés et al., 2001; Peña et al., 2003; Peña et al., 2004a). Embora as razões para isto não estejam completamente esclarecidas, sugere-se que o plasma seminal de porções específicas do ejaculado exerça um efeito positivo sobre os espermatozóides (Peña et al., 2003).

Como citado no tópico anterior (2.3), existem diferenças na quantidade e no tipo de proteínas totais do plasma seminal nas diferentes frações do ejaculado nos suínos; portanto, as diferenças de capacidade fecundante dos espermatozóides das frações, estão relacionadas às suas diferenças quantos as proteínas do plasma seminal (Caballero et al., 2004).

Vale enfatizar, contudo, que embora Saravia (2008) mencione que os perfis das proteínas do plasma seminal tenham sido muito estudados (Caballero et al., 2004; Caballero et al., 2005; Caballero et al., 2006; García et al., 2006; Jonakova et al., 2007; Manaskova & Jonakova, 2008), outros componentes do plasma seminal

como o conteúdo de íons de extrema importância para a função espermática, especialmente o cálcio e o bicarbonato (Rodríguez-Martínez et al., 1990; Rodríguez-Martínez, 1991), deveriam receber maior atenção.

Não se sabe, até o presente, as razões pelas quais os espermatozoides presentes na fração P1 do ejaculado apresentam maior resistência para sobreviver aos processos de diluição, estocagem, e congelamento/descongelamento.

Entretanto, diferenças na composição do plasma seminal associado a eles tem sido implicadas como o fator responsável (Rodríguez-Martínez et al., 2008).

Segundo Saravia et al. (2010), três aspectos têm sido considerados nesse processo: 1- a menor quantidade de proteínas do plasma seminal de origem das glândulas acessórias; 2- a presença de proteínas do plasma epididimário; 3- o menor conteúdo de bicarbonato. Todos esses fatores sugerem que a P1 mantém alguns recursos peculiares da cauda do epidídimo (Saravia et al., não publicado, citado por Saravia et al., 2010).

Além da leve diferença qualitativa e grande diferença quantitativa encontrada na P1 do ejaculado, no que diz respeito às proteínas do plasma seminal em relação às outras frações do ejaculado (Rodríguez-Martínez et al., 2005), essa fração também apresenta menor concentração do íon bicarbonato (Saravia et al., 2010).

O bicarbonato tem um importante papel na função espermática, como a de desencadear a motilidade espermática nos espermatozoides oriundos do epidídimo (Okamura et al., 1985; Rodríguez-Martínez, 1991), através da ativação direta da adenil ciclase nos mesmos. Sob certas condições *in vitro* (Gadella e Van Gestel, 2004), ou *in vivo* (Tienthai et al., 2004), o bicarbonato também é a molécula que inicia o rearranjo lipídico na membrana plasmática dos

espermatozoides, considerado um dos eventos iniciais da capacitação espermática (Harrison et al., 1996; Gadella e Van Gestel, 2004; Tienthai et al., 2004).

De acordo com Rodríguez-Martínez et al. (1990), a concentração do íon bicarbonato difere entre as três frações do ejaculado, sendo de  $14.5 \pm 2.1$  na fração pré-espermática, de  $17.3 \pm 2.4$  na fração rica, aumentando na fração pós-espermática, para  $33.7 \pm 0.4$  mM/L. De maneira comparativa, pode-se concluir que a fração P1 (10-15 mL da fração rica) apresenta a menor concentração de bicarbonato ( $13.7 \pm 0.6$  mM/L) dentro do ejaculado (Saravia et al., 2010).

A concentração de bicarbonato também varia ao longo da tuba uterina, de  $0.0 \pm 1.2$  mM/L no segmento do reservatório espermático, até  $33.1 \pm 1.5$  mM/L na ampola, onde ocorre a fertilização (Rodríguez-Martínez, 2007). Considerando-se que os espermatozoides oriundos da P1 são os principais colonizadores do reservatório espermático na fêmea (Rodríguez-Martínez et al., 2005), Saravia et al. (2010) sugerem que as baixas concentrações de bicarbonato presentes em pontos específicos dos reservatórios espermáticos masculino e feminino seriam parte da estratégia para preservar esses espermatozoides intactos, até o momento da cobertura/ejaculação ou ovulação (Rodríguez-Martínez, 2007).

Considerando-se que os primeiros espermatozoides liberados da cauda do epidídimo estão presentes na P1 do ejaculado, Saravia et al. (2008) consideram que a baixa concentração de bicarbonato dessa fração se deve à presença de um volume ainda remanescente do plasma epididimário e baixa quantidade de secreção das glândulas vesiculares. Contudo, a menor concentração de bicarbonato na P1 levou a uma melhor sobrevivência dos espermatozoides dessa fração ao protocolo de

congelamento/descongelamento, quando comparada à do restante do ejaculado (Saravia et al., 2007).

Com respeito às diferenças de viabilidade espermática observada entre essas frações do ejaculado, vários estudos indicam que os espermatozoides presentes na porção I (primeiros 10 mL da fração rica) resistem melhor às manipulações, tais como estocagem à temperatura ambiente, ao resfriamento ou ao congelamento/descongelamento em relação aos espermatozoides presentes na porção II (Rodríguez-Martinez et al., 2005). Diferenças na viabilidade espermática (motilidade e integridade de membrana) e alterações semelhantes a capacitação foram estudadas nos espermatozoides da porção I e comparadas às observadas nos da porção II, imediatamente após a coleta, após a estocagem a 18 ou 5°C e após o congelamento/descongelamento. De acordo com os autores, a fração do ejaculado teve um efeito significativo na integridade da membrana ( $p < 0,01$ ), sendo mais alta nas células espermáticas da Fração 1. Além disso, ao se avaliar os padrões de motilidade, a frequência de espermatozoides apresentando movimento circular foi maior nos da Fração 2 ( $p < 0,02$ ).

Tem sido observadas diferenças quanto à sobrevivência espermática em diferentes frações do ejaculado. A cinética dos espermatozoides foi determinada por meio de análise computadorizada – CASA, em ejaculados de varrões durante a criopreservação e após o descongelamento, quando se observou ser a sobrevivência espermática da Fração 1 (primeiros 10 mL da fração rica) superior à da Fração 2 (restante do ejaculado). As avaliações foram feitas em quatro estágios específicos: S1= após a coleta, sendo os espermatozoides diluídos em BTS; S2= à 15°C, após resuspensão dos espermatozoides em lactose-gema de ovo,

S3= à 5°C, após resuspensão dos espermatozoides em lactose-gema de ovo, glicerol e Equex; S4= aos 30 minutos após o descongelamento. Segundo os autores, a proporção total de espermatozoides móveis foi sempre maior na Fração 1 do que na Fração 2. A motilidade espermática apresentou-se superior na Fração 1 em relação à Fração 2 em todos os estágios (Rodríguez-Martinez et al., 2005), confirmando relatos anteriores da natureza benéfica dessa porção particular do ejaculado, no que diz respeito à manutenção da motilidade em suínos.

#### **2.4.2.2 Fertilidade do sêmen de varrões submetidos a colheita total ou fracionada**

Há muito tem sido observado que os espermatozoides encontrados no epidídimo são menos susceptíveis às injúrias provocadas pelo choque térmico, do que aqueles encontrados no ejaculado. Tais resultados estão associados às mudanças na maturação espermática, durante a sua passagem pelo epidídimo, quando ocorre uma redução no conteúdo total dos fosfolipídios da membrana (Lasley e Bogart, 1994).

Os espermatozoides do ejaculado total reagem de maneira mais sensível ao resfriamento, em relação aqueles que se originam da fração rica (Polge, 1956). Pursel et al. (1973) também observaram que os espermatozoides da fração rica do ejaculado seriam mais tolerantes ao resfriamento rápido, e conseqüentemente mais resistentes às injúrias causadas pelo choque térmico. Segundo Weber (1989), a redução da resistência ao choque térmico das células espermáticas presentes no ejaculado total se deve a uma grande diluição de certos componentes protetores presentes na fração rica do ejaculado.

Entretanto, resultados apresentados por Paquignon (1984), contradizem os dos

autores apresentados anteriormente. Assim, de acordo com este autor, quando os espermatozoides são diluídos e preservados por até cinco dias, a taxa de parto obtida ao se utilizar os espermatozoides oriundos do ejaculado total foi significativamente mais alta que a obtida com os espermatozoides oriundos da fração rica do ejaculado. Da mesma forma, Meding (1976) relatou menor taxa de gestação quando o sêmen foi diluído sem plasma seminal.

Importantes diferenças entre frações do mesmo ejaculado foram demonstradas por Xu et al. (1996), quanto à taxa de penetração de oócitos e poliespermia. Os autores coletaram ejaculados fracionados de varrões, divididos em frações de 15 mL. A contribuição e a variabilidade das diferentes frações desses ejaculados em testes de fertilidade, envolvendo a fecundação *in vitro* (FIV), foram avaliadas. Com base na concentração espermática, foram definidas três frações: o primeiro pico encontrado na concentração espermática (Fração 1), a parte do ejaculado com menor concentração espermática coletada posteriormente à Fração 1 (Fração 2), e um segundo pico de concentração espermática (Fração 3). Quando o efeito das três frações na FIV foram investigadas, observou-se que os espermatozoides presentes na fração 2 apresentaram menor capacidade fertilizante do que aqueles das frações ricas. Embora não houvesse diferenças entre as duas frações ricas do ejaculado (Frações 1 e 3), a fertilização tendeu a ser menor na segunda fração rica (Fração 3). Diante desses resultados, sugeriu-se a utilização somente da Fração 1 para os procedimentos de FIV, de forma a reduzir a variabilidade encontrada entre diferentes ejaculados, oriundos do mesmo macho.

Visando-se identificar se a variabilidade na capacidade funcional das três frações do ejaculado encontrados no experimento anterior, estava ligada ao plasma seminal ou ao próprio espermatozoide, o mesmo grupo

de pesquisadores incubou espermatozoides oriundos da primeira fração rica do ejaculado (Fração 1) com o plasma seminal de cada uma das três frações do mesmo ejaculado (Zhu et al., 2000). As diferenças encontradas na taxa de penetração entre os espermatozoides incubados com o plasma seminal da Fração 1 de aproximadamente 75%, quando comparada com a da Fração 2, de aproximadamente 49%, sugerem que diferentes frações do plasma seminal, contém substâncias com efeitos variados sobre os espermatozoides e sua capacidade de fertilizar oócitos *in vitro*.

#### **2.4.3 Tempo para a diluição do sêmen**

Os espermatozoides são diluídos no fluido seminal oriundo das glândulas acessórias durante a ejaculação, sendo a motilidade mantida por algumas horas. Para aumentar a sobrevivência dos espermatozoides *in vitro*, torna-se necessário reduzir a sua atividade metabólica através de inibidores químicos ou da redução da temperatura, após a diluição do sêmen (Johnson et al., 2000). Os espermatozoides de mamíferos apresentam um aumento inicial em sua atividade após a diluição, seguido por uma redução da motilidade e aumento dos danos às membranas (Johnson et al., 2000).

Palmer (1984) trabalhando com sêmen equino, estudou o efeito do intervalo entre a ejaculação e a primeira diluição sobre a sobrevivência espermática após a diluição de 36 ejaculados, dentro de dois ou dez minutos pós-ejaculação. A sobrevivência espermática (% motilidade após a conservação/ % motilidade inicial) foi de  $43,0 \pm 4,0$  e  $35,0 \pm 3,0$  ( $p < 0,05$ ) para o sêmen diluído até dois ou dez minutos, após a ejaculação, respectivamente. Além disso, o autor, ao comparar o sêmen diluído dentro de dois minutos após a ejaculação com o sêmen diluído no momento da ejaculação (diluidor dentro do recipiente de colheita do sêmen), não observou diferenças ( $p > 0,05$ )

quanto à sobrevivência espermática, entre os dois sistemas ( $45,0 \pm 4,0$  e  $43,0 \pm 3,0$ , respectivamente).

#### **2.4.4 Diluidores de sêmen suíno**

O diluidor, diluente ou extensor é definido como uma solução aquosa que permite um aumento no volume do ejaculado até uma quantidade necessária para a distribuição das doses inseminantes, enquanto preserva a função espermática e mantém a fertilidade satisfatória (Gadea, 2003). Os espermatozoides estão contidos no plasma seminal que fornece os nutrientes necessários para manutenção de alto nível de atividade metabólica, necessário para o transporte ao longo do trato genital feminino. O sêmen ejaculado apresenta a capacidade de manter sua atividade metabólica por poucos minutos, devendo por essa razão ser diluído em meio apropriado e submetido à uma redução da temperatura de estocagem que permite sua preservação por maior período de tempo (Gadea, 2003; Estienne et al., 2007).

Os espermatozoides de varrões são muito sensíveis ao choque pelo frio devido às suas características físico-químicas (Pursel et al., 1973). Esta susceptibilidade faz com que seja necessário a conservação das doses inseminantes entre  $15^{\circ}\text{C}$  e  $20^{\circ}\text{C}$ , pois diante de redução extrema da temperatura de estocagem, mais limitada será a sua viabilidade (Kommisrud et al., 2002). Entretanto, estocagem a essas temperaturas limita o tempo de estocagem das células, em decorrência do metabolismo espermático não ser suficientemente reduzido, além do controle sobre a contaminação microbiológica não ser tão efetivo como seria em temperaturas mais baixas, como as de  $5^{\circ}\text{C}$ .

Por outro lado, a diluição do sêmen envolve uma redução nos níveis de certos íons e moléculas que estão presentes no plasma

seminal e possuem uma função importante na viabilidade espermática, tais como o íon potássio ( $\text{K}^+$ ) (Harrison et al., 1978) e proteínas do plasma seminal. Considerando-se que a redução dessas substâncias deve alterar a viabilidade espermática, os diluidores devem apresentar uma formulação apropriada para suprir essas ausências. Desta forma, a albumina sérica bovina (BSA) ou algumas proteínas vegetais têm sido adicionadas aos diluidores com objetivo de melhorar a preservação espermática em virtude dessas proteínas estimularem a motilidade espermática (Waberski et al., 1989) e assim, o desempenho reprodutivo do sêmen armazenado (Waberski et al., 1994a).

##### **2.4.4.1 Componentes dos diluidores**

Para ser eficiente, um diluidor deve prover nutrientes para manter o metabolismo espermático (monossacarídeos, tais como glicose e frutose), proteger do choque pelo frio (BSA), controlar o pH do meio (bicarbonato, Tris, Hepes) e a pressão osmótica (NaCl, KCl, citrato de sódio) além de inibir o crescimento bacteriano (antibióticos) (Estienne et al., 2007).

A seguir, estão apresentados os principais componentes utilizados nos diluidores de sêmen suíno:

###### **2.4.4.1.1 Água**

A água é um componente essencial e de grande importância para a preservação do sêmen. Afinal, mais de 80% do diluidor é composto por água, sendo a sua qualidade um fator de fundamental importância para preservar a viabilidade das células espermáticas durante o período de estocagem. A obtenção de doses inseminantes de alta qualidade está diretamente relacionada à água utilizada no laboratório, uma vez que esta pode ser fonte

de contaminação química, física e microbiológica.

Dentre os órgãos que definem a qualidade da água estão a American Society for Testing and Materials (ASTM), o *Nacional Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)* e o *College of American Pathologists (CAP)*, dentre outros. Com base em determinadas características, a água pode ser classificada em quatro tipos conforme sua composição, sendo que na preparação do diluente, apenas os tipos I ou II devem ser utilizados. Em relação à contaminação bacteriana, o tipo I deve ser livre e o tipo II deve apresentar, no máximo, 10 UFC mL<sup>-1</sup> (Marchetti, 2008, citado por Goldberg, 2009). O desejável é que esta água não apresente agentes contaminantes e possua baixa condutividade elétrica, ou seja, mínima ou nenhuma presença de minerais. Essas características são importantes para prevenir lesões espermáticas principalmente de acrossoma (Bortolozzo et al., 2005a). A água do tipo I é altamente purificada e requer a combinação de deionização, destilação, filtração e osmose reversa, enquanto a do tipo II é obtida através de dupla destilação (Flowers, 1998).

Entre os principais contaminantes da água, encontram-se substâncias orgânicas e inorgânicas, solúveis e insolúveis, além de microorganismos que podem se aderir aos recipientes de estocagem e resinas de troca iônica ou carvão ativado, tornando difícil sua remoção e levando à contaminação da mesma (Silva et al., 2006).

Os equipamentos mais utilizados para a purificação da água são os destiladores e os deionizadores. É aconselhável que o deionizador seja colocado antes do destilador, uma vez que impede o acúmulo de minerais, como o cálcio, no destilador. Além disso, a água que sai do destilador tem maior chance de ser recontaminada durante a passagem pelo deionizador,

prejudicando a eficiência do processo (Bortolozzo et al., 2005a).

A deionização é um processo no qual a água passa em resinas trocadoras de íons, efetuando a remoção de sólidos e gases ionizados dissolvidos. As resinas de troca catiônica trocam seus íons hidrogênio (H<sup>+</sup>) por contaminantes catiônicos, como o cálcio, magnésio e sódio. As aniônicas trocam seus íons hidroxila (OH<sup>-</sup>) pelos contaminantes aniônicos, como clorato, sulfato e nitrato. A pureza da água na saída do processo pode ser determinada pela medição de sua condutividade elétrica, que sempre será reduzida de acordo com a eficiência da purificação, sendo que as águas tipo I e II devem ter no máximo 0,06 e 1,0 µS/cm respectivamente (Marchetti, 2008, citado por Goldberg, 2009).

O processo de destilação consiste em elevar a temperatura da água até o ponto de ebulição em uma coluna de evaporação. O vapor passa então por um condensador resfriado voltando ao estado líquido, transformando-se em uma água mais pura do que a original. Este sistema remove partículas e bactérias, mas não as substâncias inorgânicas (Silva et al., 2006). Dentre suas vantagens cita-se a possibilidade de uso contínuo e manutenção acessível, sendo as suas limitações a manutenção preventiva, a limitação de vazão dos equipamentos e o grande consumo de água e energia (Marchetti, 2008, citado por Goldberg, 2009).

A água vai perdendo seu padrão com o tempo de armazenamento. Recomenda-se, por isso, produzir somente a quantidade de água a ser consumida de imediato. Se for necessário armazená-la, deve-se usar recipiente estéril e que seja guardada resfriada, na ausência de luz solar (Laz Rosas, 1999).

#### **2.4.4.1.2 Açúcares**

Os espermatozóides são capazes de produzir energia necessária para manter o metabolismo celular e batimentos flagelares, principalmente utilizando-se da via glicolítica. Esse processo ocorre nas mitocôndrias, as quais estão localizadas na peça intermediária (Gadea, 2003).

No diluidor, a fonte de energia disponível geralmente é a glicose, embora outras fontes como a galactose, ribose e trealose também tenham sido utilizadas, sem apresentar resultados melhores que os obtidos utilizando-se a glicose (Gadea, 2003).

A glicose e a sacarose diferem de outras substâncias utilizadas na preparação dos diluidores por serem não ionizáveis, considerando-se que certos íons são prejudiciais aos espermatozóides, quando em altas concentrações.

Os espermatozóides dos suínos apresentam um sistema complexo de otimização dos seus níveis de energia. Os espermatozóides procedentes de ejaculados frescos mostram uma grande tendência de consumo de monossacarídeos através da via glicolítica, considerando-se que menos de 1% da energia obtida da glicose provém do Ciclo de Krebs (Marín et al., 2003). Entretanto, as células espermáticas dos varrões também mostram diferenças em sua habilidade de utilizar diferentes tipos de açúcares, sendo a glicose o monossacarídeo mais facilmente consumido através da glicólise, em relação a outros, tais como a frutose, o sorbitol e a manose (Medrano et al. 2003). Estas diferenças estão intimamente relacionadas com a capacidade dos espermatozóides de fosforilar esses açúcares.

Os espermatozóides dos suínos também podem se utilizar de outras substâncias como substratos energéticos. Assim, o lactato (Jones 1997), o glicerol (Jones et al. 1992) e o citrato (Calvin e Tubbs, 1978)

podem ser utilizados pelos espermatozóides para obter energia, ainda que esta seja menor que a obtida pela glicose. Contudo, como a glicólise não é utilizada em substratos como o lactato e o citrato, estes são metabolizados diretamente através do Ciclo de Krebs (Calvin e Tubbs, 1978; Jones, 1997).

#### **2.4.4.1.3 Eletrólitos**

Os eletrólitos são substâncias não metálicas que, em solução tornam-se condutores iônicos usados para regular a pressão osmótica. Íons inorgânicos, como cloreto de potássio e cloreto de sódio, são adicionados aos diluidores para balancear a pressão osmótica.

Em geral, a osmolaridade de uma solução isotônica é similar à do plasma sanguíneo, cerca de 300 mOm kg<sup>-1</sup>. A maioria dos diluidores utilizados para o resfriamento do sêmen, tal como o Belsville Thawing Solution (BTS) são isotônicos (Schilling e Vengust, 1986). A osmolaridade de uma solução hipotônica é menor que 300 mOm kg<sup>-1</sup>, enquanto em uma solução hipertônica, a osmolaridade é maior que 300 mOm kg<sup>-1</sup> (Schilling e Vengust, 1986).

#### **2.4.4.1.4 Macromoléculas**

##### **2.4.4.1.4.1 Gema de ovo**

Na espécie bovina, os protocolos de preservação do sêmen foram, há muito, estabelecidos. Entretanto, na maioria das espécies ainda não estão disponíveis ou são ineficientes, devido à falta de conhecimento do efeito protetor proporcionado pela gema de ovo aos espermatozóides (Bergeron e Manjunath, 2006).

Tem sido demonstrado que a gema de ovo aumenta a capacidade fecundante dos espermatozóides quando presente nos

diluidores de sêmen a serem estocados à temperatura ambiente (Shannon e Curson, 1983) e parece prevenir danos às células espermáticas durante o resfriamento e congelamento (De Leeuw et al., 1993).

A gema de ovo é normalmente utilizada em uma concentração de 20% nos diluidores. Tem sido sugerido que as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) são os constituintes da gema de ovo responsáveis pela proteção dos espermatozoides (Moussa et al., 2002; Amirat et al., 2004). Entretanto, o mecanismo pelo qual elas exercem essa proteção ainda permanece desconhecido. Uma das possibilidades é que as LDL se associem à membrana espermática e forneçam uma proteção aos espermatozoides por estabilizar a membrana. Entretanto, há evidências contraditórias a respeito dessa associação das LDL com a membrana dos espermatozoides (Watson, 1975; Foulkes, 1977; MacDonald e Foulkes, 1981). Uma segunda hipótese sugere que os fosfolipídios presentes nas LDL formem uma “capa” na superfície dos espermatozoides proporcionando proteção às células (Quinn et al., 1980) ou substituindo os fosfolipídios da membrana perdidos ou danificados durante o processo de preservação (Foulkes et al., 1980; Graham e Foote, 1987). A terceira hipótese sugere que as LDL compitam com peptídios catiônicos prejudiciais presentes no plasma seminal, ligando-se à membrana espermática e portanto protegendo os espermatozoides (Vishwanath et al., 1992).

Recentemente, Bergeron e Manjunath (2006) sugeriram um novo mecanismo de ação da gema do ovo. Segundo os autores, proteínas ligadoras de lipídios (proteínas BSP) presentes no plasma seminal do touro são prejudiciais à preservação espermática, pois induzem a remoção do colesterol e fosfolipídios da membrana espermática. Entretanto, de acordo com os autores, essas proteínas prejudiciais interagem com as

LDL, presentes na gema de ovo, minimizando desta forma, a remoção de lipídios da membrana espermática, o que influencia positivamente na estocagem dos espermatozoides resfriados ou congelados. Os autores sugerem, ainda, baseando-se em várias linhas de evidência, o sequestro das proteínas BSP pela LDL como o principal mecanismo de proteção espermática exercido pela gema de ovo.

Pode ser que também no sêmen de varrões haja essa interação das LDL com algum fator prejudicial presente no plasma seminal, de forma a permitir que a gema de ovo exerça seu efeito protetor sobre as células espermáticas.

#### **2.4.4.1.4.2 Albumina sérica bovina**

Componentes especiais têm sido adicionados aos diluentes de sêmen suíno com o intuito de prevenir ou retardar alterações da estrutura e função da membrana plasmática, merecendo ênfase a albumina sérica bovina (BSA), uma proteína plasmática obtida do sangue bovino, composta por mais de 580 aminoácidos, formando uma macromolécula tridimensional, sendo sua seqüência espécie específica (Weitze, 1990b).

A ação primária da BSA é estimular a motilidade espermática devido a sua alta afinidade por várias substâncias de baixo peso molecular envolvidas na remoção do fator inibitório dos espermatozoides, sem alteração do metabolismo energético, pois não ocorre qualquer modificação na concentração de ATP. Além disso, está ligada à remoção de produtos lipídicos danificados da membrana, modificando a sua permeabilidade, além de reduzir a ação da peroxidase lipídica. A BSA, quando comparada com outras macromoléculas, tais como a Polivinilpirrolidona (PVP) e a  $\beta$ -lactoglobulina, foi mais efetiva, pois seu

efeito independe da concentração de íons como  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{HCO}^{-3}$  ou  $\text{PO}^{-3}_4$  (Weitze, 1990a).

Atualmente, esta macromolécula tem sido utilizada, predominantemente nos diluidores de longa duração, tais como o MR-A<sup>®</sup>, o Zorlesco<sup>®</sup>, o Modena<sup>®</sup> e o Androhep<sup>®</sup>.

#### 2.4.4.1.5 Tampões

Imediatamente após a ejaculação, o pH do sêmen é de aproximadamente  $7,4 \pm 0,2$ , similar ao de outros fluidos orgânicos. Contudo, quando o pH diminui, o metabolismo energético dos espermatozoides e sua motilidade também são reduzidos. O lactato é o principal metabólito resultante desse processo biológico, sendo que a análise bioquímica desse metabólito pode ser utilizada como parâmetro da qualidade do sêmen (Rigau et al., 1996).

Assim, a adição de tampões ao diluidor é necessário para controlar o pH. Vários tipos de tampões são utilizados, diferenciando-se entre sistemas simples, tais como bicarbonato ou citrato de sódio, onde ambos apresentam uma habilidade limitada no controle do pH, e sistemas mais complexos, tais como o Tes, o Hepes, o Mops ou o Tris, que são capazes de regular o pH com grande eficiência, mesmo em situações onde ocorrem mudanças na temperatura (Gadea, 2003).

O pH de diluidores comerciais, normalmente varia de 6,8 a 7,2, contudo, deve-se considerar dois fatores importantes na utilização desses produtos. Primeiro, o pH não será estabelecido no meio, até 90 minutos após a diluição do produto em água, e segundo, diferentes produtos apresentam padrões diferentes de valores do pH em decorrência do tempo (Newth e Levis, 1999). Por estas razões, cuidados

especiais são necessários quando se prepara o diluidor, no sentido de se evitar problemas posteriores, durante o procedimento de preservação espermática.

#### 2.4.4.1.6 Quelantes

Alguns diluidores apresentam o ácido etilenodiaminotetracético, bem conhecido pela sigla EDTA. O EDTA é uma substância quelante que captura íons bivalentes, especialmente o cálcio ( $\text{Ca}^{++}$ ), acreditando-se que limite o seu movimento para o interior da célula espermática, prevenindo o início da capacitação e/ou da reação acrossômica.

A inclusão de EDTA nos diluentes foi um passo importante e muito difundido quando da utilização do sêmen armazenado de forma líquida (Johnson et al., 2000).

#### 2.4.4.1.7 Antioxidantes

A peroxidação dos lipídios ocorre nas espécies reativas ao oxigênio durante a preservação do sêmen, podendo ser agravada na presença de maior proporção de ácidos graxos insaturados e do baixo nível de antioxidante verificado nos espermatozoides. Assim, a suplementação com vários tipos de antioxidantes tem melhorado a viabilidade e motilidade espermáticas no sêmen diluído ou criopreservado de várias espécies (Funahashi e Sano 2005).

O butilato de hidroxitolueno (BHT) é um antioxidante e possui uma solubilidade extremamente baixa em soluções aquosas (LEVIS, 2000). O BHT atua na membrana plasmática aumentando a sua fluidez e tornando as células espermáticas do varrão menos susceptíveis ao choque térmico (Bamba e Cran, 1992).

A adição de BHT ao diluidor BTS aumentou significativamente os percentuais

de motilidade e de acrossomas normais, no sêmen armazenado por seis dias a 5°C (Bamba e Cran, 1992).

Outros antioxidantes, tais como a vitamina E solúvel, a glutathione, a cisteína e a N-acetil-cisteína têm sido acrescentados aos diluidores para criopreservação ou armazenamento, quando em temperaturas inferiores à 12°C. A cisteína age como um estabilizador de membrana e inibidor da capacitação espermática (Johnson et al., 2000).

Funahashi e Sano (2005) testaram diferentes antioxidantes e verificaram que a cisteína e a glutathione podem melhorar a longevidade e a integridade acrossômica dos espermatozoides de suínos, quando preservados à 10°C. A cisteína vem sendo utilizada em diluidores comerciais de longa duração, tais como o Modena e o MR-A.

#### **2.4.4.1.8 Antibióticos**

Os antibióticos são adicionados aos diluidores para evitar o crescimento bacteriano, pois a presença de nutrientes tais como a glicose, além da temperatura de estocagem das doses refrigeradas à 15°C, permitem o desenvolvimento de bactérias gram-negativas como a *Escherichia coli*, *Salmonella sp.* e *Pseudomonas sp.* Além disso, a contaminação bacteriana causa várias alterações da função espermática, como redução da sua função, aglutinação, reação acrossômica e diminuição do pH para níveis ácidos, entre 5,7 e 6,4 (Althouse et al., 2000), resultando em uma perda da longevidade espermática, quando da estocagem das doses inseminantes.

Mais de 13 gêneros de bactérias foram encontrados no sêmen suíno contaminado, tanto do tipo entérico (*Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*) quanto não entérico (*Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas ssp.*, *Alcaligenes xylooxidans*) (Althouse et al., 2000).

Inicialmente, a penicilina + estreptomicina foi a combinação mais freqüentemente utilizada; entretanto, os aminoglicosídeos começaram a ser utilizados com sucesso, incluindo a gentamicina, neomicina e kanamicina (Gadea, 2003).

Ao avaliar o comportamento da população bacteriana, em amostras de sêmen armazenadas em BTS, à diferentes temperaturas (5, 12 ou 17°C), na ausência de antimicrobianos, Katzer et al. (2001) verificaram que após 120h de armazenamento as amostras mantidas a 5°C apresentavam menor número de unidades formadoras de colônias, em relação às mantidas a 12 ou 17°C, confirmando que as temperaturas usuais de armazenamento do sêmen suíno (15 a 18°C) não impedem a multiplicação bacteriana.

#### **2.4.4.2 Tipos de diluidores do sêmen de varrões**

Os diluidores de sêmen podem ser divididos em dois grupos principais: os desenvolvidos visando a preservação do sêmen por um curto período de tempo (até 3 dias), e os desenvolvidos visando a estocagem do sêmen por um longo tempo (mais que 4 dias) (Gadea, 2003) (tabela 2).

Tabela 2. Classificação dos diluidores como de curta ou de longa duração

<b>Tempos de estocagem do sêmen</b>	
<b>Curto período de tempo (1-3 dias)</b>	<b>Longo período de tempo (mais que 4 dias)</b>
Beltsville Liquid (BL-1)	Acromax <sup>®</sup>
Beltsville Thawing Solution (BTS)	Androhep <sup>®</sup>
Illinois Variable Temperature (IVT)	Modena
Kiev	MR-A <sup>®</sup>
Vital <sup>®</sup>	Mulberry III <sup>®</sup>
	Reading
	X-Cell <sup>®</sup>
	Zorlesco
	Zorpva

Adaptado de Gadea, 2003

As vantagens dos diluidores preconizadas para o armazenamento do sêmen, por longo período de tempo incluem a possibilidade de transportes à longas distâncias, realização de testes no sêmen antes de sua utilização, como por exemplo, a reação em cadeia da polimerase (PCR) para detectar a presença de vírus, ou uma análise completa da qualidade seminal antes de sua utilização (Gadea, 2003).

Com relação aos constituintes dos diluidores (tabela 3), a partir dos anos 60, ocorreu uma grande inovação no que se refere à formulação, devido à adição de um agente quelante (EDTA) ao meio, visando bloquear a ação do cálcio como um mediador da capacitação espermática e/ou da reação acrossômica. Neste aspecto, vale enfatizar o diluidor de Kiev (Plisko, 1965), subsequente modificação sob vários nomes (EDTA, Merck I, Plisko, Guelph). O diluidor de Kiev foi o responsável pela expansão da IA em suínos pelo mundo (Gadea, 2003).

Já nos anos 70, pesquisas realizadas no Beltsville Center (USA) envolvendo métodos de preservação do sêmen suíno, resultaram no diluidor BTS (Beltsville Thawing Solution) (Pursel e Johnson, 1975), proposto inicialmente como um

meio de descongelamento do sêmen e, posteriormente, adaptado para o sêmen resfriado (Johnson et al., 1988). Certamente, o diluidor BTS é o mais amplamente utilizado no mundo (Gadea, 2003).

O diluidor BTS é caracterizado por conter uma pequena quantidade de potássio, de forma a preservar a bomba de sódio/potássio e, portanto, evitar uma diminuição do potássio intracelular, intimamente relacionado à uma redução da motilidade (Alvarez e Store, 1982).

O primeiro diluidor desenvolvido e, então classificado como de longo tempo de preservação, foi o Zorlesco (Gottardi et al., 1980). Este meio relativamente complexo, é composto de Tris como um regulador do pH, albumina sérica bovina (BSA) e o aminoácido cisteína (Gadea, 2003). Assim como outros compostos apresentando um grupo sulfidril, a cisteína é um estabilizador de membranas e apresenta capacidade de inibição da capacitação (Johnson, 2000). A utilização desse diluidor em condições de campo produz resultados insatisfatórios, particularmente devido a um desbalanço na sua composição, que resulta em uma baixa pressão osmótica final (240 mOsm).

Posteriormente, foi desenvolvido o diluidor de Modena por Moretti (1981), no qual aumentou-se a proporção de glicose associada a redução da BSA do diluidor de Zorlesco; contudo, os resultados de fertilidade ainda apresentaram-se insatisfatórios (Johnson, 1988; Laforest e Allard, 1996).

Paralelamente, os pesquisadores Martín-Rillo e Alias desenvolveram o diluidor MR-A (Martín Rillo, 1984, citado por Gadea, 2003), e embora sua composição não seja

divulgada por razões comerciais, seu desempenho como diluidor de longa duração tem sido boa (Gadea, 2003).

Weitze (1990b) desenvolveu o diluidor Androhep, envolvendo o Hepar como regulador de pH e a BSA para compensar o “efeito diluição” sobre as proteínas do plasma seminal, sendo um diluidor de natureza levemente hipertônica (309 mOsm) (Gadea, 2003). Este diluidor também é utilizado consideravelmente no setor de produção suína como um meio de longa duração.

Tabela 3. Composição e classificação de alguns diluidores usados na preservação do sêmen suíno

Composição (g/L)	Diluidores								
	Curta duração			Longa duração					
	IVT	KIEV	BTS	Zorlesco	MRA	ZORPVA	Reading	Modena	Androhep
<b>Glicose</b>	3,0	60,0	37,0		+	11,5	11,5	25,0	26,0
<b>Citrato de Sódio</b>	24,3	3,7	6,0	11,7	+	11,65	11,65	6,9	8,0
<b>EDTA</b>	-	3,7	1,25	2,3	+	2,35	2,35	2,25	2,4
<b>Bicarbonato de Sódio</b>	2,4	1,2	1,25	1,25	+	1,75	1,75	1,00	1,2
<b>Cloreto de Potássio</b>	0,4	-	0,75	-	-	-	-	-	-
<b>Acetil-Cisteína</b>	0,05	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>HEPES</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	9,0
<b>BSA</b>	-	-	-	5,0	+	-	-	3,00	2,5
<b>Tris</b>	-	-	-	6,5	-	5,5	5,5	5,65	-
<b>Citrato</b>	-	-	-	4,1	-	4,1	4,1	2,00	-
<b>Cisteína</b>	-	-	-	0,1	+	0,7	0,7	0,05	-
<b>Trealose</b>	-	-	-	-	-	-	1	-	-
<b>PVA</b>	-	-	-	-	-	1	1	-	-
<b>Acetato de Potássio</b>	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<b>MOPS</b>	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<b>mOsm</b>	290	380	330	240	290	275	300	282	309
<b>pH</b>	-	7,2	7,2	-	-	-	-	-	-

Adaptado de Gadea, 2003

A eficiência dos diluidores quanto aos resultados de fertilidade tem sido extensivamente avaliada. Contudo, esses estudos utilizando o sêmen de varrões têm

sido conduzidos em condições muito diferentes, incluindo a raça, condições ambientais, número de inseminações, número de espermatozoides por dose,

momento da IA (Gadea, 2003), devendo portanto, as comparações serem feitas com cautela.

De acordo com Hofmo (1991), o diluidor BTS causou uma redução significativa na fertilidade quando o sêmen foi armazenado por 48 horas, enquanto o número de nascidos totais e nascidos vivos diminuíram significativamente após 24 horas de resfriamento. Resultados similares foram obtidos por Alexopoulos et al. (1996) que notou uma redução da fertilidade quando o sêmen foi estocado por mais que 72 horas em BTS.

Já Martinez et al. (1986) demonstraram que o diluidor MR-A foi capaz de manter a mesma fertilidade e número de nascidos vivos, quando o sêmen foi estocado por até cinco dias. Em outro estudo, demonstrou-se que a fertilidade diminuiu significativamente quando o sêmen foi preservado com MR-A por 6-7 dias, embora o tamanho da leitegada não tenha sido afetado (Lyczynski e Kolat, 1996). Embora uma maior taxa de sobrevivência espermática (mensurada como motilidade) tenha sido observada nos diluidores de longa duração (MR-A e Androhep), se comparadas ao diluidor de Kiev, de curta duração (Korniewicz et al., 1996), essa diferença não foi observada quando o Androhep foi comparado ao BTS (Waberski et al., 1994c).

Em outros estudos envolvendo a comparação de diluidores de curta duração, demonstrou-se que o diluidor BTS foi mais eficiente que o Kiev, o Zorlesco e o Modena em termos de fertilidade (Aalbers et al., 1983; Blichfeldt et al., 1988).

Em outra comparação envolvendo um diluidor de longa duração (MR-A) e um de curta duração (Kiev), nenhuma diferença na fertilidade ou tamanho da leitegada foi notada nos primeiros 3-4 dias de

estocagem, embora o diluidor de longa duração permitisse a utilização do sêmen por até 7 dias, sem perda significativa nos parâmetros reprodutivos avaliados (Ratto e Jokinen, 1990). Resultados similares foram demonstrados por Johnson et al. (1988), quando comparou-se o diluidor BTS com o MR-A e o Modena. Os autores não observaram nenhuma diferença significativa entre os diluidores BTS e MR-A quando utilizados por até 4 dias, embora a taxa de fertilidade e o tamanho da leitegada tenham sido significativamente superiores aos encontrados com o diluidor Modena após a IA de porcas multíparas. Similarmente, Hofmo et al. (1998) não observaram nenhuma diferença significativa ao comparar o sêmen preservado em BTS por 2-3 dias com o preservado em MR-A por 4-5 dias.

Laforest e Allard (1996) compararam os diluidores MR-A, BTS, Modena e Androhep e não encontraram qualquer diferença significativa na fertilidade envolvendo o diluidor ou o tempo de preservação (1-2 dias *versus* 3-4 dias).

Em outro estudo, Dimitrov et al. (2009) compararam os parâmetros bioquímicos e biológicos, e os resultados de fertilidade do sêmen suíno diluído nos diluidores BTS, no MR-A e no DZNB, armazenados por 48 horas antes da IA. Após o período de tempo avaliado, a motilidade diminuiu significativamente nas amostras diluídas em BTS e DNZB, e o número de espermatozóides anormais, aumentou significativamente no sêmen diluído em BTS. Em relação aos parâmetros bioquímicos, os autores demonstraram não haver variação do pH em nenhum dos diluidores, enquanto a concentração de piruvato diminuiu, embora sem significância, e a de ácido láctico tenha aumentado significativamente. Segundo os autores, a maior fertilidade foi obtida utilizando-se o diluidor MR-A (94,44%)

dentro de 0-12 horas após a coleta, e com o diluidor BTS (87,10%), após 24-48 horas de armazenagem.

A concentração de piruvato como produto metabólico final da via glicolítica, após a diluição do sêmen, pode ser utilizada como parâmetro de avaliação, considerando-se que tanto ele quanto o ácido láctico, resultam de um acelerado metabolismo anaeróbico dos espermatozoides. Esse metabolismo anaeróbico é um mecanismo compensatório para a necessidade de energia dos espermatozoides presentes no sêmen diluído (Dimitrov et al., 2009).

Há poucos estudos envolvendo a preservação do sêmen suíno a 5°C visando avaliar a sua eficiência “in vivo”, através da mensuração dos parâmetros de fertilidade, tais como das taxas de prenhes, de parto, de retorno ao cio e do tamanho da leitegada.

Kasuya e Kawabe (1977) utilizando o sêmen diluído em um diluidor contendo leite em pó desnatado, glicose, bicarbonato de sódio, tris e glicina, armazenado a 5°C e preservado por 7 dias, inseminaram 17 porcas e 13 leitões e obtiveram 10,2 e 5,2 leitões nascidos vivos, respectivamente. Posteriormente, Park et al. (1996) utilizaram o sêmen diluído em um diluidor lactose-gema de ovo com 2% de glicerol, preservado por 6 a 7 dias a 5°C e obtiveram uma taxa de parto de 85%, com 10,4 leitões nascidos vivos por leitegada.

Foote (2002) utilizou o sêmen diluído em um diluidor a base de gema de ovo, resfriado a 5°C e preservado por 48 horas para inseminar 70 leitões e 55 porcas, e obtiveram uma média 10,1 leitões nascidos. A taxa de parto foi de 63%, sendo que as porcas pariram 1,5 leitões a mais em relação às primíparas.

Braga et al. (2009a) compararam a fertilidade *in vivo* de dois tratamentos,

envolvendo no grupo controle o sêmen diluído em BTS e armazenado em geladeira a 17°C, comparado a um tratamento em que o sêmen foi diluído no diluidor glicina-gema (Foote, 2002) e armazenado em contêiner especial, a 5°C (Roner, 2006). Segundo os autores, observou-se superioridade ( $p < 0,05$ ) do sêmen diluído em glicina-gema de ovo no que se refere à manutenção das características físicas (motilidade e vigor), decorridas 19,79 horas de armazenamento. Foote (2002) utilizando o mesmo diluidor do segundo tratamento do presente estudo, verificou que a motilidade não declinou mais do que 10% durante as primeiras 48 horas de armazenamento à 5°C, similarmente ao observado no trabalho. Quanto ao desempenho reprodutivo das fêmeas, observou-se influência ( $p < 0,05$ ) de tratamento sobre a taxa de concepção, de 97,14% quando se utilizou o sêmen diluído em BTS® e estocado a 17°C por 18,39 horas, e 77,14% com sêmen diluído em glicina-gema e estocado a 5°C, em contêiner especial. Entretanto, não se verificaram diferenças ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos, no que se refere ao número médio de nascidos totais (14,87 vs 10,72) e vivos (13,26 e 10,12), respectivamente, para o primeiro e segundo tratamentos.

Em outro estudo comparando-se os efeitos dos diluidores de Kiev, Lactose-gema e Mínima-Contaminação sobre parâmetros espermáticos do sêmen de suínos armazenado à temperatura de 16°C ou 5°C, Nascimento (1998) demonstrou que os diluidores lactose-gema e Kiev, embora preservassem a integridade do acrossoma, não mantiveram a motilidade e longevidade espermáticas à 5°C, ao contrário do que observou-se no de mínima contaminação, quando a motilidade e o vigor mantiveram-se por 72 horas, tanto à temperatura de 16°C como de 5°C, embora à 5°C houvesse alta frequência de edema acrossomal.

De acordo com Gadea (2003), a escolha do diluidor deve ser feita de acordo com a finalidade de sua utilização. Quando utiliza-se o sêmen com menos de três dias de coleta, o mais correto seria utilizar-se os diluidores de curto tempo de armazenagem (BTS ou Kiev por exemplo), em virtude de serem mais baratos e apresentarem resultados similares àqueles de longo tempo de armazenagem. Entretanto, quando as doses de sêmen necessitam ser preservadas por mais que quatro dias antes da IA, os diluidores classificados como de longo tempo de armazenagem deveriam ser os mais indicados.

#### **2.4.4.3 Regulação do pH e da pressão osmótica**

A pressão osmótica varia entre diluidores comerciais preconizados para o sêmen de varrões a ser resfriado, variando de 240 a 380 mOm kg<sup>-1</sup>, uma variação de osmolaridade que os espermatozoides dos varrões são capazes de suportar. De acordo com Fraser et al. (2001), nem a motilidade e nem a viabilidade espermáticas são comprometidas quando a pressão osmótica varia de 250 a 390 mOm Kg<sup>-1</sup>. Entretanto, danos às células espermáticas são observados quando a pressão osmótica é menor do que 200 mOm kg<sup>-1</sup> (Fraser et al., 2001).

Na maioria das vezes, diluidores isotônicos (300 mOm kg<sup>-1</sup>) ou levemente hipertônicos tem sido relatados como os melhores para manter a função espermática nas doses destinadas à inseminação artificial (Schilling e Vengust, 1986). Sais haletos, tais como cloreto de sódio (NaCl) e cloreto de potássio (KCl) são os componentes mais utilizados nos diluidores de sêmen para regular a pressão osmótica.

#### **2.4.4.4. Controle da qualidade microbiológica do sêmen**

A contaminação bacteriana do sêmen suíno pode ocorrer tanto durante a coleta como no processamento do mesmo (Althouse et al., 2000). O macho pode ser a fonte primária de contaminação bacteriana das doses inseminantes, entretanto, outras fontes de contaminação não podem ser desprezadas tais como o meio ambiente, os funcionários responsáveis pela manipulação do sêmen e a água utilizada na preparação do diluidor (Althouse e Lu, 2005). Doses inseminantes com contaminação bacteriana apresentam redução da motilidade e do pH, aumento da aglutinação, bem como de anormalidades acrossômicas e de células mortas (Althouse et al., 2000).

Considera-se quase impossível uma coleta de sêmen livre de qualquer contaminação. Entretanto, Althouse et al. (2000) e Bortolozzo e Wentz (2005) propuseram alguns cuidados que devem ser tomados visando diminuir a contaminação bacteriana durante a coleta. Dentre eles, vale salientar: a limpeza do macho, adequada higienização prepucial pré-coleta com sobre-luva, adequada fixação do pênis, descarte dos primeiros jatos do ejaculado, utilização de luvas descartáveis específicas para cada coleta, utilização de filtros para separação da porção gelatinosa do ejaculado, descarte dos filtros antes do envio da amostra para o laboratório e habilidade do coletador para realizar o procedimento.

A contaminação química proveniente das luvas de coleta, especialmente as de látex, também desempenha um importante papel na redução da viabilidade espermática. Scheid et al. (1995) relataram que as luvas empregadas na coleta podem possuir

substâncias tóxicas aos espermatozóides, que levam à redução do percentual de espermatozóides móveis.

Segundo Goldberg (2009), pêlos prepuciais compridos (>1,0 cm), a luva de coleta suja, líquido pingando pela mão do coletador para o interior do recipiente de coleta e coleta com duração superior a sete minutos

são os fatores que aumentaram o grau de contaminação do ejaculado.

Segundo Althouse e Lu (2005), algumas medidas preventivas podem ser tomadas com o objetivo de reduzir a contaminação desde a coleta até o processamento da dose inseminante (tabela 4).

Tabela 4. Etapas a serem seguidas desde a coleta do sêmen até a preparação das doses inseminantes

<b>Etapa I – Preparação do varrão</b>	
1.	Aparar os pêlos em torno do óstio prepucial
2.	Usar sempre duas luvas em cada mão, sendo a primeira para higienizar o varrão e a segunda exclusivamente para realizar a coleta do sêmen
3.	Entre cada coleta, usar luvas de vinil ou higienizar bem as mãos para reduzir o risco de contaminação.
4.	Antes da coleta, massagear o divertículo prepucial para a retirada do líquido
5.	Limpar bem ao redor do prepúcio
<b>Etapa II – Coleta do sêmen</b>	
1.	Antes de iniciar a coleta, no laboratório (área limpa), colocar um filtro ou gaze dobrada sobre o copo coletor aquecido
2.	Tracionar o pênis perpendicularmente de forma a minimizar a contaminação durante a coleta, evitando que algum fluido prepucial caia diretamente no copo coletor
3.	Desprezar os primeiros jatos do ejaculado, a fração pré-espermática e a fração gel
<b>Etapa III – Processamento do sêmen no laboratório</b>	
1.	Usar preferencialmente produtos descartáveis, se forem economicamente viáveis
2.	Materiais a serem reutilizados e que não possam ser esterilizados com calor ou água fervente devem ser lavados com detergentes que não deixem resíduos, enxaguados várias vezes com água destilada e, por último, com álcool 70%, aguardando a completa vaporização do resíduo para serem guardados
3.	Limpar superfícies e equipamentos ao final do dia com detergente apropriado
4.	Desinfetar os pisos ao final do dia com desinfetantes como, por exemplo, fenóis
5.	Instalar luz ultravioleta, quando possível, visando à higienização dos materiais reutilizáveis e das superfícies do laboratório, usando precauções de segurança para os funcionários.
6.	A sala de coleta e manequim deverão ser limpos e desinfetados ao final da última coleta do dia

Adaptado de Althouse e Lu (2005)

#### **2.4.5 Efeito da taxa de diluição, volume da dose inseminante e concentração espermática por mL e por dose inseminante**

A alta diluição dos espermatozóides, como ocorre durante a separação espermática por

citômetro de fluxo, por exemplo, pode reduzir a sua motilidade e viabilidade. Esses efeitos podem ser minimizados pelo uso de um meio apropriado de diluição e coleta, contendo sais balanceados, fontes de energia, gema de ovo e algumas proteínas. Essa alta diluição, que envolve a remoção do plasma seminal, também desestabiliza as

membranas espermáticas, tendo como consequência a capacitação dos espermatozoides. Esta capacitação pode ser revertida no sêmen do varrão, pela inclusão do plasma seminal ao meio utilizado para a manipulação do sêmen (Maxwell e Johnson, 1999).

As alterações as quais são submetidos os espermatozoides quando o sêmen é diluído, tem sido consideravelmente estudadas. A monta natural envolve a deposição de um grande número de espermatozoides em um alto volume de plasma seminal. Quando o sêmen é processado para a inseminação, o número de espermatozoides e a proporção de plasma seminal em cada dose de sêmen é consideravelmente reduzida (Kirkwood et al., 2008).

A diluição dos espermatozoides de mamíferos com pequenos volumes de solução salina fisiológica, ou outras soluções isotônicas, produz uma ativação ou excitação da motilidade. Entretanto, se a diluição for excessiva, há uma perda permanente da motilidade, da atividade metabólica e da capacidade fertilizante *in vivo*, conhecidos como “efeito diluição” (Mann, 1964). O autor ainda sugere que o mecanismo de inativação espermática devido à excessiva diluição, assemelha-se à uma senescência da célula espermática durante o armazenamento, como um resultado do choque pelo frio, devido a evidência de que tais tratamentos certamente resultam na desestabilização das membranas espermáticas e danos em sua função.

Considera-se ótima uma taxa de diluição (sêmen:diluidor) de 1:10 (Martin Rillo et al., 1994) ou entre 1:5 e 1:15 (Ruvalcaba, 1994), dependendo da concentração espermática do ejaculado. Sobre o assunto, Johnson et al. (2000) citam que normalmente a taxa de diluição do sêmen não ultrapassa a de 1:10. As doses

inseminantes que têm pequena taxa de diluição, ou seja, menor que 1:5, apresentam baixa viabilidade espermática devido à carência de substratos energéticos e à perda da capacidade tamponante do meio (Flowers, 1996). Alexpoulos et al. (1996) observaram decréscimo significativo da motilidade espermática em doses inseminantes com menor diluição ( $5 \times 10^9$  de spz/dose inseminante) quando comparada à de doses apresentando maiores taxas de diluição ( $1 \times 10^9$  ou  $3 \times 10^9$ ). Os autores atribuíram o fato ao pobre ambiente metabólico gerado nas doses com menor diluição. Por outro lado, a razão pela qual ocorre uma redução da fertilidade e viabilidade espermáticas nas doses inseminantes submetidas a uma alta taxa de diluição ( $>1:15$ ) não é totalmente explicada, embora possa estar relacionada a um fenômeno chamado choque osmótico (Flowers, 1996; Levis, 1997). Almond et al. (1994) estabeleceram que o sêmen suíno diluído, deve ter no mínimo  $1,5 \times 10^9$  e no máximo  $6,0 \times 10^9$  de espermatozoides/dose inseminante, em um volume mínimo de 50 mL.

Segundo Levis (1997), a taxa ótima de diluição também depende das características físicas do diluidor utilizado, tais como pH, pressão osmótica e capacidade tamponante. Quando diluidores de longa duração, como o MR-A, são utilizados, a taxa ideal de diluição é de 1:8 a 1:15 (Ruvalcaba, 1994). No entanto, utilizando-se o diluidor de Kiev, esta taxa deve oscilar entre 1:7 e 1:11 (Perez Marcos et al., 1991).

De acordo com Catt et al. (1997), a diluição do sêmen do varrão e do carneiro no diluidor BTS, poderia manter a viabilidade dos espermatozoides com ou sem a adição do plasma seminal. Diante disso, pode ser que metabólitos simples ou componentes iônicos, seriam os componentes mais importantes do plasma seminal para a

manutenção da viabilidade espermática, inclusive mais importantes que as proteínas. Portanto, o “efeito diluição” dos espermatozoides poderia ser minimizado pelo uso de um meio isotônico contendo sais balanceados e fontes de energia (Mann e Lutwak-Mann, 1981).

Ashworth et al. (1994) demonstraram que os espermatozoides do carneiro morreram rapidamente após uma extensiva diluição, na ausência de plasma seminal, mas que a motilidade foi substancialmente mantida quando o meio de diluição foi suplementado com cerca de 10% de plasma seminal homólogo.

O efeito do plasma seminal sobre a capacidade fertilizante dos espermatozoides necessita ser considerado separadamente da ativação da motilidade (Maxweel e Johson, 1999). Assim, o plasma seminal de diferentes machos pode ter efeitos variáveis tanto na motilidade como na fertilidade dos espermatozoides, como demonstrado em touros por Killian et al. (1993).

Entretanto, os vários estudos que avaliaram os efeitos do plasma seminal sobre a fertilidade dos espermatozoides são conflitantes. Desta forma, a variação na presença, ausência ou na concentração de certos componentes, provavelmente proteínas, no plasma seminal, devem ser responsáveis pela variabilidade desses efeitos na fertilidade espermática (Maxweel e Johson, 1999).

Observa-se que a maioria do plasma seminal não acompanha os espermatozoides durante sua ascensão ao local de fertilização no trato reprodutivo feminino, sugerindo que sua remoção é necessária para a aquisição da capacidade fertilizante, e deve ser um importante fator no processo de capacitação (Maxweel e Johson, 1999).

Há considerável evidência de que processos tais como a diluição, incubação,

resfriamento, separação por citômetro de fluxo e o congelamento/descongelamento alteram a função dos espermatozoides, devendo alguns desses efeitos estarem associados à remoção do plasma seminal. Estas alterações funcionais permitem que os espermatozoides adquiram a capacidade imediata de fertilizar oócitos *in vitro*, ou *in vivo* após a deposição próximo ao local de fertilização (Rath e Niemann, 1997; Rath et al., 1997; Seidel et al., 1997), embora, com redução de sua longevidade, possivelmente, resultando em morte prematura dos espermatozoides quando depositados à uma distância do local de fertilização (Gillan e Maxwell, 1999).

Neste contexto, Catt et al. (1997) demonstraram que a adição de 10% de plasma seminal do carneiro ou varrão ao meio de diluição, aumentou a motilidade e viabilidade dos espermatozoides que haviam sido diluídos 400 ou 20 vezes, respectivamente, embora esse efeito benéfico tenha dependido do tipo de diluidor. O efeito benéfico do plasma seminal foi mais frequentemente refletido por um aumento da motilidade espermática. Ainda, a utilização do plasma seminal heterólogo (dentro de cada espécie) foi geralmente prejudicial. Finalmente, os mesmos autores enfatizam que o aumento da viabilidade observada nos espermatozoides do carneiro, após a adição do plasma seminal, foi em parte, devido à redução da proporção de células aglutinadas.

Atualmente, o volume da dose inseminante mundialmente utilizado em suínos varia entre 80 a 100 mL, visando-se assegurar o transporte de número suficiente de espermatozoides para a junção útero-tubárica. Entretanto, o volume da dose inseminante pode ser reduzido por influência da raça ou do local de deposição do sêmen. Assim, Almond et al. (1998) estabeleceram que o volume mínimo da dose inseminante deve ser de 50 mL.

Do ponto de vista fisiológico, é razoável supor que existem duas características básicas que são diretamente responsáveis pela influência do varrão sobre o tamanho da leitegada: o número de espermatozóides inseminados e a proporção destes que podem fertilizar os oócitos com sucesso. A capacidade fecundante das células espermáticas está freqüentemente relacionada à qualidade dos espermatozóides e pode ser estimada através de vários parâmetros (Flowers, 2002).

Inicialmente, quando o número de espermatozóides inseminados é baixo, reflete-se em um prejuízo na fertilidade. Com o aumento do número de espermatozóides por dose inseminante, observa-se um aumento positivo da fertilidade. Entretanto, a magnitude dessa resposta diminui, gradualmente, na medida em que o número de células inseminadas é aumentada, até atingir um limite máximo (Flowers, 2002). Salisbury e Vandemark (1961) referiram essa relação como curva ou padrão de fertilidade. De acordo com os autores, a partir desse limite máximo (platô), o aumento da concentração espermática por dose inseminante, não afetará a fertilidade, em virtude da população de espermatozóides presentes no reservatório espermático, necessários para concluir o processo de fertilização, já ser suficiente.

A concentração espermática/dose inseminante é a variável mais influenciada pelos diferentes locais de deposição do sêmen. Em bovinos por exemplo, normalmente a inseminação é realizada no corpo do útero com uma dose de  $20 \times 10^6$  de espermatozóides. Isso significa que em torno de 1000 vacas poderiam ser inseminadas a partir de um único ejaculado, o que tornou a prática comercialmente viável. No caso dos suínos, a inseminação comercial utiliza uma dupla inseminação,

com cerca de  $3 \times 10^9$  de espermatozóides por dose. Se cada varrão produz entre  $20-75 \times 10^9$  de espermatozóides por ejaculado, há quantidade suficiente para inseminar aproximadamente 12 fêmeas, quando se utiliza sêmen resfriado. Quando se trata de sêmen criopreservado, entretanto, o número de fêmeas que podem ser inseminadas é ainda mais reduzido. Considerando-se que apenas a fração rica em espermatozóides do ejaculado é coletada e que o número de espermatozóides necessários por dose aumenta para cerca de  $5 \times 10^9$  por dose inseminante, apenas cinco fêmeas poderiam ser inseminadas por ejaculado, um número indiscutivelmente pequeno, considerando-se o limite inferior. Ao considerar-se ejaculados com aproximadamente  $60 \times 10^9$ , cerca de 20 e 12 doses seriam produzidas quando do uso do sêmen diluído e resfriado ou congelado, respectivamente.

De acordo com Watson e Behan (2002), as novas técnicas que utilizam cateteres desenvolvidos para a IUI permitem reduzir a dose para  $1 \times 10^9$  espermatozóides utilizando sêmen fresco. Já com os cateteres para a IIP com sêmen fresco, a dose pode ser reduzida para  $50 \times 10^6$  de espermatozóides (Martinez et al. 2002), ambos sem comprometimento da fertilidade. Utilizando sêmen congelado com a técnica de IIP, Roca et al. (2003) reduziu a dose de 6 para  $1 \times 10^9$  de espermatozóides sem comprometer a taxa de parto ou tamanho da leitegada.

No entanto, há evidências para reforçar o conceito de que machos apresentam diferentes padrões de fertilidade com base no número de espermatozóides inseminados, e que há diferença entre os indivíduos. Duas hipóteses centrais para a existência de padrões de fertilidade, são que os machos diferem quanto ao seu potencial de fertilidade quando o mesmo número de espermatozóides são inseminados e que aumentando-se o número de

espermatozoides inseminados aumenta-se a fertilidade em alguma parte da curva de fertilidade (Flowers, 2002).

Johnson et al. (1981, 1982) realizaram dois estudos e demonstraram claramente que a fertilidade dos machos é diferente quando utiliza-se doses inseminantes com o mesmo número de espermatozoides. Em ambos os estudos, doses contendo  $3 \times 10^9$  de espermatozoides foram utilizadas para inseminar as porcas uma vez entre 12 e 24 h após o início do estro. A variação média do tamanho da leitegada, entre 24 varrões avaliados, foi de 8,8 a 12,2 leitões. Estes dados fornecem evidências de que a fertilidade do varrão, mensurada pelo tamanho da leitegada, pode variar consideravelmente entre indivíduos diante de uma mesma concentração espermática por dose inseminante.

Ao contrário dos trabalhos citados anteriormente, Xu et al. (1998) não observaram diferenças entre varrões, embora houvesse um efeito positivo do número de espermatozoides inseminados sobre o tamanho da leitegada. Foram utilizadas doses contendo 2 ou  $3 \times 10^9$  de espermatozoides, oriundas de seis varrões, sendo as fêmeas suínas inseminadas três vezes durante dois dias de estro. A variação média no tamanho da leitegada encontrada pelos autores, foi de 10,2 a 11,5 quando as doses inseminantes continham  $3 \times 10^9$  de espermatozoides, e entre 9,1 e 10,1 leitões quando  $2 \times 10^9$  de espermatozoides/dose inseminante foram utilizados. Houve um efeito da dose inseminante sobre o tamanho da leitegada, mas nenhuma interação entre dose inseminante e varrão.

Em resumo, três conclusões a respeito da relação entre tamanho de leitegada, individualidade dos varrões e número de espermatozoides inseminados podem ser citadas. Primeiramente, o tamanho da leitegada difere entre varrões quando são utilizadas doses inseminantes contendo o

mesmo número de espermatozoides; o aumento do número de células espermáticas por dose inseminante, resulta em um aumento do tamanho da leitegada, para alguns varrões; e finalmente, a magnitude da resposta no tamanho da leitegada em decorrência do aumento no número de espermatozoides por dose inseminante não é o mesmo para todos os varrões (Flowers, 2002).

#### **2.4.6 Tempo de incubação prévia do sêmen ou “holding time”**

É bem conhecido que os espermatozoides do varrão são muito susceptíveis ao choque pelo frio. O resfriamento rápido do sêmen recém diluído, de  $35^{\circ}\text{C}$  para  $15^{\circ}\text{C}$  acarreta uma redução significativa da motilidade, enquanto o resfriamento lento em etapas de  $10^{\circ}\text{C}$ , aumenta a resistência ao frio (Johnson et al., 2000). Desta forma, a pré-incubação por cerca de 24 horas antes de uma possível redução da temperatura abaixo de  $15^{\circ}\text{C}$  melhora a resistência espermática ao choque pelo frio, um efeito que deve ser considerado na rotina de trabalho em laboratório (Weber, 1989).

O conceito para a utilização do “holding time” é mais importante para o sêmen congelado do que para o resfriado (Crowell, 2009). Os espermatozoides do varrão podem adquirir resistência ao choque pelo frio se incubados a baixas taxas de diluição, por 1-5 horas em temperatura ambiente (Pursel et al., 1972; Pursel et al., 1973). Outros autores demonstraram um aumento na proporção de espermatozoides apresentando resistência ao choque pelo frio, quando o tempo de holding time foi elevado para 16-24 horas (Weber, 1989; Tamuli e Watson, 1994).

Weber (1989) avaliou o efeito de diferentes temperaturas ( $25$ ,  $20$  e  $15^{\circ}\text{C}$ ) e períodos de incubação (0, 4, 8 e 24 horas), antes do resfriamento para  $5^{\circ}\text{C}$ . Os percentuais de

motilidade e de acrossomas normais do sêmen incubado, independentemente da temperatura, foram significativamente melhores que os do sêmen não incubado. O sêmen incubado por 24 horas à 20°C apresentou a maior motilidade (68%), embora o percentual de acrossomas normais (74%) não tenha diferido dos resultados obtidos com o sêmen submetido à quatro horas de incubação à 25°C, contrastando apenas com os valores de 19% de motilidade e 62% de acrossomas normais, para o sêmen resfriado a 5°C, sem incubação prévia. O período de oito horas de incubação à 20°C resultou em 85% de acrossomas normais e 65% de motilidade.

Tamuli e Watson (1992) observaram que espermatozóides incubados a 20°C apresentaram maior resistência ao choque térmico do que a temperaturas de 30°C ou 40°C. Maxwell e Johnson (1997) constataram que um período de incubação de 3,5 horas à 15°C, antes do resfriamento a 5°C, foi benéfico para a integridade da membrana e sobrevivência dos espermatozóides, posteriormente submetidos ao congelamento.

O mecanismo que induz resistência aos espermatozóides do varrão é desconhecido, embora certamente envolva mudanças na composição da membrana e aumento da estabilidade das proteínas, resultando em alterações na superfície celular (Watson e Plummer, 1985).

#### **2.4.7 Efeito da taxa de resfriamento do sêmen de varrões em contêiner especial**

Tanto o sêmen resfriado quanto o congelado, estão sujeitos ao choque pelo frio durante a coleta e processamento. Watson e Plumer (1985, citado por Crowell, 2009) foram os primeiros a sugerir que a susceptibilidade dos espermatozóides ao choque pelo frio, seria influenciada internamente pela composição de colesterol

e fosfolipídio da membrana. A função da membrana sofre alteração quando submetida à uma redução da temperatura, que por sua vez aumenta a dispersão de cátions e enzimas, resultando em aumento da permeabilidade. Posteriormente, demonstrou-se que o aumento da permeabilidade da membrana, juntamente com a mudança de fase, permitem o fluxo dos íons cálcio para o meio intracelular e a capacitação espermática (Watson, 1996), o que resulta em uma população sub-fértil de espermatozóides.

Há vários fatores que podem influenciar a habilidade dos espermatozóides em suportar os efeitos prejudiciais de um resfriamento rápido, tal a composição do diluidor, a taxa de resfriamento e o tempo de incubação (holding time) do sêmen. Pursel et al. (1972) demonstraram que os espermatozóides adquirem resistência ao choque pelo frio durante incubação à 5°C. Assim, mesmo quando o sêmen é estocado à 15°C, recomenda-se incluir no protocolo, um holding time à mesma temperatura ou abaixo dela, para diminuir os efeitos do choque pelo frio, por um período de duas a oito horas (Eriksson et al., 2001).

O resfriamento normalmente ocorre a uma taxa menor que 5°C por hora, sendo a motilidade reduzida durante o armazenamento caso o resfriamento seja realizado à taxas mais rápidas (Dzuik, 1958). Normalmente, o sêmen é diluído e resfriado à temperatura ambiente por duas horas, antes de ser colocado na unidade de resfriamento (Bamba e Cran, 1985) ou armazenado imediatamente à 15 ou 17 °C (Kuster e Althouse, 1999).

Após a coleta e diluição do sêmen, as doses inseminantes encontram-se, normalmente, à temperatura de 35 a 39°C. Entretanto, a temperatura de estocagem recomendada para o sêmen do varrão situa-se no intervalo entre 15 e 18°C. Conseqüentemente, o

sêmen diluído sofre uma redução de cerca de 20°C entre a diluição e a estocagem. Os dois métodos de resfriamento do sêmen suíno mais utilizados, são os resfriamentos lento e rápido, os quais diferem pela taxa de redução da temperatura por período de tempo. Assim, o resfriamento lento permite a redução da temperatura até cerca de 25°C em temperatura ambiente, antes de ser armazenado à 16-18°C. Acredita-se que nesse tipo de resfriamento, o sêmen entre em equilíbrio à temperatura ambiente antes de ser armazenado, com menores danos sendo causados às células espermáticas. Por outro lado, quando do resfriamento rápido, o sêmen diluído, apresentando uma temperatura média de 35°C é submetido diretamente à unidade de resfriamento à 16-18°C.

Observações importantes sobre o tema foram obtidas por Weber (1989), trabalhando com sêmen de suíno, quando observou-se não ser o resfriamento rápido, de 20°C até 15°C, tão prejudicial às células espermáticas, estando a faixa crítica abaixo da temperatura de 15°C. O autor conduziu um experimento com o objetivo de examinar sob condições de resfriamento definidas, o efeito do choque térmico sobre os espermatozoides do varrão. Os resultados demonstram que a percentagem de espermatozoides móveis e a integridade acrossomal foram diferentes, quando comparou-se o resfriamento rápido com o lento. Assim, à 35°C a motilidade e integridade do acrossoma foram de 81,7% e 96%, respectivamente. Porém, à temperatura de 5°C a motilidade foi de 12% e a integridade acrossomal de 44,9% no resfriamento rápido, e de 48,3% e 88,4%, respectivamente, no resfriamento lento. Ainda de acordo com o autor, no resfriamento rápido de 35°C para 5°C, a percentagem de espermatozoides móveis caiu significativamente, embora no resfriamento gradual e lento, a sobrevivência espermática tenha sido mais elevada, mesmo à temperatura de 5°C. As

curvas lentas de resfriamento associadas à incubação prévia do sêmen diluído, antes do resfriamento, para uma temperatura inferior a 15°C, resultaram em aumento da resistência espermática ao choque térmico.

Nascimento et al. (1998) avaliaram os efeitos da taxa de resfriamento (rápida ou lenta) à 16 ou 5°C sobre a motilidade, sobrevivência e morfologia espermáticas de varrões, sendo o sêmen diluído nos diluidores lactose-gema, Kiev e mínima contaminação. A duração do período de resfriamento até a estabilização à 16°C foi de quatro horas nos três diluidores e de sete a oito horas até a estabilização à 5°C. Os autores verificaram que a preservação da motilidade e longevidade espermáticas foram satisfatórias à 16°C, por um período de 72 horas, nos diluidores de Kiev e mínima contaminação. Entretanto, no sêmen diluído em lactose-gema, esses parâmetros caíram significativamente dentro de 72 horas. Com relação ao sêmen estocado à 5°C, a sobrevivência e o vigor dos espermatozoides só foram preservados, adequadamente, no diluidor de mínima contaminação, tanto no resfriamento lento como no rápido. Em relação aos demais diluidores, esses parâmetros sofreram uma redução a partir de 24 horas de armazenamento para valores inferiores à 10% no que se refere à motilidade e menos de um para o vigor. Observou-se ainda, que as lesões acrossômicas foram similares, tanto no resfriamento lento como no rápido, à temperatura final de armazenamento de 5 ou 16°C.

Com objetivo de avaliar o efeito da taxa de resfriamento sobre a qualidade do sêmen suíno resfriado, Crowell (2009) coletou o sêmen de três machos diferentes, com três repetições cada, sendo alíquotas de cada ejaculado diluídas em diluidor BTS ou Androhep Plus. As taxas de resfriamento utilizadas no experimento foram: 1- taxa de resfriamento rápida, quando as amostras diluídas eram introduzidas imediatamente

em incubadoras à 12°C por uma hora, e posteriormente transferidas para a unidade refrigeradora à 17°C; 2- taxa de resfriamento intermediária, quando as amostras diluídas eram diretamente armazenadas na unidade refrigeradora à 17-19°C, considerado como o grupo controle e 3- taxa de resfriamento lenta, quando as amostras diluídas eram mantidas à temperatura ambiente por duas horas e meia, antes de serem transferidas para a unidade refrigeradora. Após o término do resfriamento das amostras pertencentes a cada tratamento, todas foram transferidas para uma unidade refrigeradora, e mantidas à 17°C durante o estudo. Para cada amostra, estimativas da qualidade do sêmen foram obtidas antes da diluição, imediatamente após a sua ocorrência (tempo 0) e às 4, 24, 48 e 96 horas após a diluição. Observou-se neste experimento, que a qualidade do sêmen não foi afetada quando os ejaculados diluídos eram colocados diretamente na unidade refrigeradora à 17°C, ou quando submetidos ao resfriamento lento, atingindo 25°C à temperatura ambiente por duas horas e meia, e posteriormente estocados à 16-18°C. Desta forma, o sêmen foi capaz de suportar uma redução de 20°C na temperatura, imediatamente após a diluição, sem que houvesse alteração da qualidade da amostra. Quando comparou-se as taxas de resfriamento para cada um dos parâmetros avaliados, as amostras resfriadas mais rapidamente, apresentaram uma redução significativa da motilidade e motilidade progressiva quando comparadas às amostras resfriadas à taxas intermediárias ou lentas, sendo que entre estas, não observou-se diferenças para nenhum dos parâmetros avaliados, sugerindo que ambos os procedimentos foram similares e não causaram efeitos nocivos aos espermatozoides.

Diante desses resultados, observou-se um choque com o estabelecido pela literatura no que se refere à necessidade do “holding

time” com o objetivo de se evitar o choque pelo frio às células espermáticas (Eriksson et al., 2001). Pode-se verificar ainda, neste trabalho, que embora as amostras submetidas às taxas de resfriamento rápido diferiram significativamente das submetidas às taxas intermediária e lenta, os valores de motilidade não foram inferiores à 60%.

Considerando-se que Flowers (1997) não encontrou diferenças quanto à capacidade fecundante dos espermatozoides apresentando motilidade acima de 60%, especula-se que os espermatozoides podem suportar redução de temperatura de 25°C, após a diluição (taxa de resfriamento rápida), sem afetar a qualidade do sêmen. Assim, a autora conclui, diante dos resultados encontrados, não ser necessário o “holding time” antes da estocagem do sêmen resfriado, o que resulta em uma economia de tempo e dinheiro durante o processamento do sêmen.

Especula-se que o resfriamento do sêmen suíno a 5°C possibilitaria o armazenamento e/ou transporte por um período de tempo superior ao rotineiramente utilizado à 15-18°C, diante da redução do metabolismo espermático e inibição do crescimento bacteriano, de forma similar ao que se têm estabelecido para o sêmen de outras espécies.

Dentro desse contexto, o desenvolvimento de novas técnicas de armazenamento e transporte do sêmen suíno tem se tornado muito importante. Vale salientar, aqui, o aumento do interesse pela utilização de machos geneticamente superiores, a necessidade de transporte do sêmen entre granjas, a existência em alguns países de centrais de IA, que distribuem sêmen entre os cooperados, e a grande extensão territorial de países, como o Brasil.

Existem dois métodos de resfriamento de sêmen descritos pela literatura, ou seja, o método ativo, caracterizado por taxas de

resfriamento pré-fixadas entre determinadas temperaturas, na presença de um mecanismo termoeletrico controlado, que produz taxas de resfriamento consistentes e lineares. Já no método passivo, ocorre a troca de calor entre o sêmen diluído e a unidade refrigeradora, até a obtenção de uma temperatura de equilíbrio. A vantagem do método passivo é o baixo custo de funcionamento, embora, apresente taxa de resfriamento variável, resultante de flutuações da temperatura ambiente e diferenças de volume a ser resfriado (Jasko et al., 1992). Já o sistema ativo de resfriamento, permite taxas controladas, sendo, portanto mais eficaz no controle das lesões provocadas pelo choque térmico aos espermatozoides. Contudo, seu alto custo e necessidade do resfriamento antes de se iniciar o transporte limita sua utilização.

Poucos estudos são encontrados na literatura como referência ao sistema de transporte do sêmen suíno. Diferentemente da espécie equina, onde existem vários contêineres desenvolvidos, entre eles o modelo Sarstedt (Van der Holst, 1984, citado por Roner et al., 2006), modelo Equitainer (Douglas-Hamilton et al., 1984), modelo Celle (Hueck, 1990, citado por Roner et al., 2006), modelos MSP-1 e MSP-2 (Silva Filho, 1994) e o modelo Palhares (1997).

Muller-Shlosser et al. (1982) citado por Roner et al. (2006) armazenaram o sêmen de varrões por quatro horas, a diferentes temperaturas (16 a 18°C, 10°C, 5°C, 0°C, -5°C e -10°C) e diferentes tipos de contêineres (maiores ou menores), embora não tenham sido especificadas as suas características termodinâmicas. Os autores verificaram melhores resultados quando o sêmen foi estocado em pequenos contêineres com temperatura interna variando entre 16 e 18°C.

Roner et al. (2006) desenvolveram um contêiner para o resfriamento e conservação

do sêmen suíno bastante simples e barato, capaz de propiciar um resfriamento lento das células espermáticas e a obtenção de duas temperaturas de estocagem do sêmen resfriado ( $17 \pm 1^\circ\text{C}$  ou  $5 \pm 1^\circ\text{C}$ ), sendo o tempo médio de manutenção dessas temperaturas de 53 e 43 horas, respectivamente. O contêiner possui uma forma compacta (33 cm de altura x 35 cm de largura), com peso de 0,9 kg vazio e 4,2 kg completo, e constitui-se de três blocos de isopor: um bloco compacto formando o fundo; um bloco central com perfurações para colocação dos blocos menores, contendo os frascos plásticos que acondicionam o sêmen diluído a ser resfriado, e uma perfuração central para colocação do sistema refrigerador, havendo, ainda um bloco com função de tampa. O bloco central do contêiner, formado de seis blocos menores, possui perfurações laterais para colocação das bisnagas plásticas, que se movimentavam sobre o bloco central, permitindo atingir a temperatura de  $17 \pm 1^\circ\text{C}$  ou  $5 \pm 1^\circ\text{C}$ . Cada bloco comporta duas bisnagas de 100 mL, totalizando 12 doses por contêiner. Por meio de aberturas laterais, do bloco central e dos blocos menores, ocorre troca de calor/frio entre os frascos e o sistema refrigerador, obtendo-se taxas de resfriamento controladas. De acordo com os autores, a taxa de resfriamento inicial ( $37 - 17^\circ\text{C}$ ) foi de  $-0,16^\circ\text{C}/\text{min}$  para a temperatura de  $17^\circ\text{C}$  e de  $-18^\circ\text{C}/\text{min}$  para a temperatura de  $5^\circ\text{C}$ . Na temperatura crítica do choque térmico ( $17 - 8^\circ\text{C}$ ) a taxa de resfriamento obtida foi de  $-0,0049^\circ\text{C}/\text{min}$ . Com relação à avaliação do sêmen, os resultados comprovaram a eficiência deste contêiner quanto à manutenção das características espermáticas por 24 a 36 horas.

Em geral, os trabalhos com suínos não fazem referência ao volume total a ser transportado, ou ao tipo de envasamento utilizado.

#### 2.4.8 Influência da temperatura final de armazenamento do sêmen

A composição dos fosfolipídios da membrana dos espermatozóides do varrão, diferentemente do que observa-se nos dos touro, tais como a baixa relação colesterol/fosfolipídios e uma distribuição assimétrica do colesterol dentro da membrana, torna as células espermáticas dessa espécie, muito susceptíveis à temperaturas mais baixas, tendo como resultante um aumento da permeabilidade e perda da função da membrana (De Leeuw et al., 1990). Dessa forma, um resfriamento rápido do ejaculado para a temperatura de 15°C ou abaixo de 15°C, resulta em perda da viabilidade ou choque pelo frio (Martín-Rillo et al., 1996; Johnson et al., 2000).

Para evitar esse choque, recomenda-se uma pré-diluição do ejaculado em temperaturas superiores à 15°C por várias horas, induzindo assim a resistência ao frio (Pursel et al., 1973). Na prática, o sêmen é coletado em recipientes isotérmicos com o intuito de se evitar o contato com superfícies mais frias, sendo a diluição subsequente realizada com o diluidor a 35-37°C (Althouse, 1997, citado por Vyt, 2007); a seguir o sêmen começa uma redução gradual da temperatura até 17°C. Geralmente, a estocagem do sêmen diluído é realizada à 17 °C, temperatura na qual o metabolismo espermático é reduzido (Althouse et al., 1998). O resfriamento para temperaturas abaixo de 12 °C provoca um efeito negativo na motilidade e integridade acrossômica *in vitro*. Entretanto, Althouse et al. (1998) não observaram nenhuma diferença na taxa de parto ou tamanho da leitegada entre doses inseminantes estocadas por 60 horas a 12 ou 17°C.

De acordo com Paulenz et al. (2000), recomenda-se que as doses de sêmen deveriam ser utilizadas dentro de 60 horas após a coleta, não devendo o sêmen ser

exposto à temperaturas abaixo de 15°C ou acima de 20°C durante o transporte e armazenagem.

O principal objetivo do resfriamento do sêmen é manter a sua viabilidade por prolongado período de tempo. Para que isto seja possível, torna-se necessário a redução do metabolismo das células espermáticas, através da redução da temperatura e/ou da utilização de diluidores específicos (Weitze, 1991).

Entretanto, devido à particular susceptibilidade dos espermatozóides da espécie suína ao choque pelo frio, a estocagem à temperaturas acima de 15°C é necessária, limitando-se dessa forma a redução do metabolismo espermático durante o tempo de armazenagem (Weitze, 1991).

Com o objetivo de descrever o efeito do longo tempo de estocagem do sêmen suíno à diferentes temperaturas, Wallgren (1998) estocou o sêmen por 72 horas a 18°C ou 24°C e observou uma redução significativa tanto na motilidade quanto da integridade acrossomal ao final do período de armazenamento. Já Venumanohararao et al. (1991) armazenaram o sêmen diluído em quatro diluidores diferentes por 96 horas a 5°C e 15 °C, e concluíram que a motilidade progressiva em todos os diluidores foi superior quando o sêmen foi armazenado à 15°C.

Alexopoulos et al. (1996) armazenaram o sêmen suíno diluído em BTS por 96 horas a 17°C, resultando em uma redução de 18,5% da motilidade inicial; além disso, a motilidade diminuiu 19,0% após o resfriamento a 20 °C e 26,9% quando do armazenamento a 15 °C. De acordo com Paulenz et al. (2000), os efeitos do choque pelo frio foram evidentes quando se armazenou o sêmen a 10 °C, havendo uma redução significativa da motilidade e da

integridade acrossômica após o resfriamento por 24 horas.

A severidade do choque pelo frio depende da taxa de resfriamento, do intervalo de temperatura e da variação de temperatura, sendo em geral mais severa no intervalo de 2 a 12 °C (Watson, 1995; Weitze, 1991).

#### **2.4.9 Duração da estocagem do sêmen de varrões**

Alterações estruturais e funcionais que os espermatozoides do varrão sofrem durante o resfriamento e estocagem assemelham-se a um processo de envelhecimento natural da célula, e são determinadas pelas condições e duração da estocagem do sêmen (Johnson et al., 2000). Durante o armazenamento *in vitro*, os lipídios da membrana espermática sofrem uma oxidação contínua, sendo os danos provocados pelos peróxidos daí resultantes similares aos provocados pelo choque térmico, e ocorrem principalmente na região acrossomal (Mann e Lutwak-Mann, 1981)

O envelhecimento dos espermatozoides ocorre durante a estocagem *in vitro* e após a inseminação, quando a população viável de espermatozoides “aguarda” a ovulação para ser liberado do segmento inferior do istmo, o reservatório espermático. Desta forma, o sucesso da fertilização é influenciado por dois períodos de envelhecimento espermático, o da estocagem *in vitro*, que pode durar até cinco dias, e o envelhecimento *in vivo*, o qual aumenta quando o intervalo entre a IA e a ovulação é superior a 12 até 24 horas (Waberski et al., 1994a; Soede et al., 1995a).

Do ponto de vista prático, uma redução da habilidade fecundante das células espermáticas não pode ser prevenida, mesmo quando utiliza-se os diluidores classificados como de longa duração.

Contudo, alguns componentes do meio, tal como a BSA, pode diminuir os efeitos da estocagem, refletidos no envelhecimento celular (Johnson et al., 2000). A célula espermática possui uma alta taxa metabólica e necessita de um constante fornecimento de energia. Quando o ejaculado é armazenado ocorre degradação da glicose e conseqüente produção de CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O e produtos ácidos, como o ácido lático, alterando o pH do meio e o período de viabilidade espermática.

Para diminuir estas e outras alterações do meio e, conseqüentemente das células, os diluidores são compostos de tampões, estabilizadores de membrana, quelantes de íons metálicos bivalentes (EDTA), antimicrobianos dentre outros, na tentativa de prolongar ao máximo a viabilidade espermática. Entretanto, todo este sistema metabólico criado artificialmente apresenta um curto período de funcionamento, ou seja, à medida que os componentes vão sendo utilizados, produtos de degradação vão se formando, o meio vai sendo modificado, sendo que as células vão envelhecendo e perdendo a viabilidade.

As alterações funcionais dentro dos diferentes compartimentos dos espermatozoides, tais como nas mitocôndrias, flagelos, e membranas acrossomais e plasmática, em decorrência do envelhecimento da célula espermática, ainda não estão totalmente compreendidas. A redução da motilidade espermática que ocorre durante a estocagem, tem sido o principal parâmetro utilizado para avaliar a redução da capacidade fertilizante dos espermatozoides. A perda de ATP e AMPc, além da redução na absorção de cálcio, são características de motilidade reduzida (Johnson et al., 2000). Outro importante fator observado durante a estocagem é o aumento da permeabilidade da membrana e a liberação de substâncias do meio intracelular.

Bennemann et al. (2005) avaliaram dois tempos de armazenamento das doses inseminantes (0 – 48 e 96 – 120 horas) relacionando-os com os intervalos inseminação-ovulação (0-12h, 13-23h, 24-30h) de leitoas. Apenas uma inseminação com 1,5 bilhões de espermatozoides foi realizada. Não foram observadas diferenças significativas na taxa de prenhes das fêmeas que receberam as doses armazenadas por até 48 horas. Entretanto, observou-se uma redução significativa nas matrizes inseminadas com doses armazenadas por um período de tempo superior, sendo de 30,8% naquelas inseminadas no intervalo de 24 – 30 horas da ovulação. Em relação ao número total de embriões, ocorreu redução significativa (6,5 embriões) apenas nas fêmeas inseminadas com as doses submetidas à um maior tempo de armazenamento, associado ao maior intervalo inseminação-ovulação.

As inseminações realizadas com sêmen fresco dentro de dois dias da coleta, não reduziram os índices de fertilidade com aumento do intervalo entre IA e ovulação (detectado por ultrasonografia). Entretanto, quando o sêmen armazenado por 48 a 72 horas foi utilizado, as taxas de fertilização diminuíram, mesmo quando a ovulação ocorreu entre 12 e 24 horas após a inseminação (Weitze et al., 1989). No mesmo sentido, Waberski et al. (1994b) citam que os resultados de fertilidade são ainda mais dependentes do momento da inseminação, relativamente à ovulação, quando o sêmen resfriado é estocado por mais que 87 horas, sugerindo um efeito aditivo do envelhecimento *in vitro* e *in vivo* das células espermáticas.

De acordo com Johnson et al. (2000), embora tenham sido observadas pequenas diferenças quanto ao tipo de diluidor utilizado para a estocagem do sêmen, a redução da capacidade fecundante devido ao envelhecimento espermático *in vitro* não

pode ser evitada, mesmo durante o primeiro dia de estocagem.

Desta forma, o envelhecimento dos espermatozoides após a ejaculação e o resfriamento se deve à um processo fisiológico, que não pode ser evitado completamente através de medidas preventivas durante a preservação, necessitando-se, assim, de maior atenção nos procedimentos de inseminação, com ênfase no momento da inseminação relativo à ovulação.

#### **2.4.10 Técnicas utilizadas para melhorar a qualidade espermática**

Embora diferentes estudos (Colenbrander et al., 2003; Christensen et al., 2004) têm demonstrado que as características do ejaculado explicam apenas uma pequena percentagem (menos que 10%) da variação nos resultados de fertilidade, mensurados pela taxa de parto, a utilização de doses seminais de alta qualidade espermática tem sido enfatizada como uma condição essencial (Vyt et al., 2004; Gillan et al., 2006). Por esta razão, o melhoramento das doses seminais e da qualidade espermática é ainda um amplo campo de pesquisa a ser explorado.

Diferentes técnicas têm sido utilizadas para melhorar a qualidade espermática, merecendo ênfase a adição de diferentes substâncias ao sêmen diluído, bem como a administração de agentes farmacológicos visando aumentar a velocidade do transporte espermático após a inseminação (Traas e Kustritz, 2004). Dentre estes agentes vale salientar a prostaglandina F<sub>2α</sub>, o ácido hialurônico e a cafeína, dentre outros.

##### **2.4.10.1 Prostaglandinas**

As prostaglandinas estão relacionadas à

vários processos reprodutivos, estando presentes no fluido seminal (Templeton et al., 1978) e muco cervical (Charbonnel et al., 1982), sendo que Roy e Ratnam (1992) demonstraram, inclusive, serem os espermatozoides humanos capazes de sintetizá-las. Esses hormônios produzem diferentes efeitos sobre a musculatura lisa da tuba *in vitro*, sendo que a PGF2 $\alpha$  aumenta a contratilidade muscular e a prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) inibe a sua contração (Lindblom, 1978).

Estudos recentes sugerem que o transporte do embrião e a interação entre o embrião e a tuba envolvem a ação da prostaglandina através de receptores para PGE<sub>2</sub> e PGF2 $\alpha$ , além do efeito das mesmas no sistema vascular e na contratilidade muscular (Wanggren et al., 2006).

O transporte espermático pelo útero é uma combinação dos transportes ativo e passivo, sendo que o transporte passivo é mediado pelas contrações uterinas, sendo que a PGF2 $\alpha$ , assim como outras prostaglandinas, melhoram tais contrações.

Ao estudarem a utilização da PGF2 $\alpha$  na reprodução em suínos, Cheng et al. (2001) adicionaram PGF2 $\alpha$  às doses inseminantes, 72 horas antes da inseminação e não observaram inativação do hormônio durante esse período, quando verificou-se aumento da contratilidade miometrial após a inseminação. Kos e Bilkei (2004) também relataram que a PGF2 $\alpha$  aumentou significativamente o desempenho reprodutivo quando suplementou-se o sêmen diluído com o hormônio.

#### **2.4.10.2 Ácido Hialurônico (AH)**

O ácido hialurônico é um membro dos glicosaminoglicanos. Diferentes estudos têm demonstrado que o AH possui um papel na reprodução dos mamíferos. Assim, quando adicionado ao sêmen, ele é capaz de melhorar a motilidade espermática dos

espermatozoides (Huszar et al., 1990; Sbracia et al., 1997; Peña et al., 2004b), além de reduzir a poliespermia, quando da fertilização *in vitro* (Suzuki et al., 2000).

Curiosamente, o AH é visto por induzir a reação acrossômica em várias espécies, inclusive em suínos (Peña et al., 2004b), embora Rodríguez-Martínez et al. (2001) observaram um retardamento desse processo *in vivo*. Em relação à capacitação espermática e ação no trato reprodutivo feminino, o AH também tem um papel chave na liberação dos espermatozoides do reservatório espermático, antes da fertilização (Liberda et al., 2006). Segundo Yeste et al. (2008b), a adição de AH atrasou a capacitação espermática após três dias de armazenamento, em relação às células do grupo controle, sem que houvesse alterações em outros parâmetros seminais.

#### **2.4.10.3 Cafeína**

A cafeína age inibindo competitivamente a enzima fosfodiesterase dentro da célula, resultando em um aumento da concentração intracelular de adenosina monofosfato cíclico (AMPc), um segundo mensageiro que aumenta a motilidade espermática (Nassar et al., 1999).

Assim, a cafeína tem sido utilizada para estimular a motilidade e a capacitação espermáticas em humanos (Rees et al., 1990), suínos (Funahashi e Nagai, 2001) e bovinos (Coscioni et al., 2001).

Com o objetivo de avaliar o efeito da adição da prostaglandina F2 $\alpha$ , do ácido hialurônico e da cafeína sobre a qualidade do sêmen do varrão, Yeste et al. (2008a) utilizaram 11 tratamentos, sendo oito destes comparando diferentes doses de PGF2 $\alpha$  (0.625, 1.25, 2.50, 5, 10, 12.50, 25 e 50 mg de PGF2 $\alpha$ /100 mL de sêmen), e outros três tratamentos envolvendo diferentes doses de PGF2 $\alpha$  associadas ao AH ou à cafeína (0.625 mg de PGF2 $\alpha$ /100 mL + 200  $\mu$ g/mL

de ácido hialurônico; 1.25 mg de PGF2 $\alpha$ /100 mL + 200  $\mu$ g/mL de ácido hialurônico; 0.625 mg de PGF2 $\alpha$ /100 mL + 7.5 $\mu$ M de cafeína). Avaliou-se no experimento, o efeito dos tratamentos ao longo de diferentes períodos de preservação, sendo o primeiro no momento da adição, e após 1, 3, 6 e 10 dias de resfriamento à 15°C em diluidor BTS. Os autores concluíram que tratamentos utilizando concentrações de PGF2 $\alpha$  superiores à 12.5 mg/100 mL foram citotóxicos para os espermatozoides do suíno. Além disso, após 6 dias de preservação, a viabilidade espermática reduziu significativamente na maioria dos tratamentos; entretanto, um aumento significativo foi observado com a utilização de 5 mg de PGF2 $\alpha$ /100 mL, e nos outros três tratamentos utilizando a associação das substâncias, sugerindo que a sua adição aos diluidores deve manter a viabilidade espermática por até seis dias de resfriamento.

#### 2.4.11 Condições ideais de estocagem e utilização do sêmen de varrões

O fator primário para o sucesso da IA com sêmen diluído, resfriado e transportado é um bom manejo desde a coleta até a inseminação.

As condições ideais para a estocagem do sêmen suíno incluem:

- a) Cuidados relacionados à coleta do ejaculado, visando-se obter um sêmen com a mínima contaminação possível, sendo para isto necessária a máxima higiene durante a coleta, adequada manipulação do sêmen pelos funcionários, redução de contaminantes no ambiente e utilização de água de boa qualidade para a preparação dos diluidores (Althouse e Lu, 2005);
- b) Avaliação cuidadosa dos parâmetros seminais após a coleta, observando-se os critérios mínimos para o processamento do ejaculado (Foxcroft et al., 2008);
- c) Utilização de ejaculados apresentando motilidade mínima de 60% (Johnson et al., 2000);
- d) Utilização de um diluidor adequado, contendo macromoléculas, visando aumentar o tempo de armazenagem do sêmen (Johnson et al., 2000);
- e) Utilizar uma taxa de diluição adequada para a espécie (Maxwell e Johnson, 1999);
- f) Incubação prévia do sêmen (*holding time*) antes do resfriamento (Pursel et al., 1972);
- g) Adequado número de espermatozoides móveis/dose inseminante, de acordo com o local de deposição do sêmen a ser utilizado (Flowers, 2002; Watson e Behan, 2002; Martinez et al. 2002);
- h) Utilização de taxas de resfriamento adequadas, observando-se que taxas lentas e intermediárias refletem em maior capacidade fertilizante dos espermatozoides após o resfriamento (Crowell, 2009);
- i) Utilização de um contêiner eficiente para manutenção da temperatura e com boa resistência física para o transporte (Silva Filho, 1994);
- j) Inseminação em momento ideal com referência à fisiologia da fêmea, respeitando-se o período ótimo entre a inseminação e ovulação (Soede et al., 1995a);

Certamente, a manutenção da qualidade das doses inseminantes e o sucesso do processo de fertilização, dependem da cooperação e trabalho conjunto de todos os envolvidos no sistema de produção.

## 2.5 Endocrinologia da Fêmea suína

### 2.5.1 Período pós-parto

A lactação nas porcas é geralmente caracterizada por um período de quiescência ovariana que resulta em anestro ou anovulação até o desmame (Varley and Foxcroft, 1990). Sabe-se que de 3 a 4 dias após o parto, há um breve período hipergonadotrófico devido a uma súbita remoção do efeito *feedback* inibitório da progesterona luteal e dos estrógenos fetoplacentários sobre o eixo hipotálamo-hipofisário (Britt et al., 1985). A maioria das porcas exibe uma intensa, porém irregular, frequência no padrão de secreção de LH e um aumento na sua concentração basal, durante esse período (De Rensis et al., 1993). Os maiores folículos encontrados durante essa fase variam de 4 a 6 mm de diâmetro, com certa quantidade de estrógeno podendo ser produzida; entretanto, geralmente não ocorre a maturação e ovulação desses folículos em porcas lactantes (Palmer et al., 1965a; Kunavongkrit et al., 1982).

O aumento da intensidade da mamada durante os primeiros dias pós-parto, provoca uma redução gradual nos níveis basais de FSH e LH acompanhadas por uma redução no tamanho e número de folículos através do processo de atresia (Palmer et al., 1965a, b; De Rensis et al., 1993; Sesti e Britt, 1994). A ativação do sistema de peptídeos opióides endógenos (POE) durante a lactação, os quais inibem a liberação de GnRH e LH e estimulam a secreção de prolactina, está envolvido nesse processo neuroendócrino (Barb et al., 1991; Foxcroft, 1992).

Pode-se considerar a segunda semana de lactação como um período de transição por que passa a fêmea. Neste período, mesmo que as concentrações periféricas de gonadotrofinas e esteróides ovarianos

continuem baixas (Stevenson e Britt, 1980), as concentrações de FSH e LH na hipófise aumentam, diante da capacidade do hipotálamo de liberar GnRH (Sesti e Britt, 1994).

À medida que a período de lactação progride, o hipotálamo gradualmente deixa de sofrer o efeito inibitório exercido pelos opióides liberados em decorrência das mamadas, que se deve parcialmente à redução de sua intensidade (Varley e Foxcroft, 1990). Com isso, durante a terceira semana de lactação, há um aumento gradual da secreção pulsátil de GnRH e de gonadotrofinas (Stevenson e Britt, 1980), bem como do número e tamanho dos folículos presentes no ovário (Palmer et al., 1965a; Kunavongkrit et al., 1982; Sesti e Britt, 1993).

### 2.5.2 Período pós-desmame

A remoção do estímulo da mamada pelo desmame na porca, causa um imediato decréscimo na secreção de prolactina, seguido por um aumento na secreção de gonadotrofinas, do crescimento folicular e das concentrações de  $17\beta$ -estradiol, que culminam na indução do estro, do pico pré-ovulatório de GnRH/LH e assim, da ovulação (Einarsson et al., 1998).

O rápido aumento da concentração de GnRH no hipotálamo, e do LH, mas não do FSH, na glândula pituitária anterior ocorre após o desmame (Cox e Britt, 1982). Estas alterações provocam um aumento das concentrações basais de LH, dentro de 8 a 12 horas pós-desmame, e um aumento da frequência dos pulsos de LH dentro de 2 a 3 dias pós-desmame. Entretanto, essa resposta é muito variável entre diferentes porcas (Cox e Britt, 1982; Shaw e Foxcroft, 1985). A concentração periférica de FSH aumenta vagarosamente após o desmame, sendo que o aumento do crescimento folicular e da concentração de  $17\beta$ -estradiol dentro de 2 a

4 dias pós-desmame são devidos, principalmente, ao aumento dos níveis basais de LH e pulsos ocasionais de LH (Stevenson et al., 1981; Shaw e Foxcroft, 1985; Sesti e Britt, 1993).

Antes do desmame, a maioria dos folículos apresentam diâmetro inferior a 5 mm; entretanto, com o aumento da concentração das gonadotrofinas pós-desmame, ocorre o desenvolvimento de folículos pré-ovulatórios que atingem um diâmetro de 8 a 10 mm, cerca de 2 a 4 dias após o desmame (Palmer et al., 1965a; Cox e Britt, 1982; Rojanasthien et al., 1987). Desta forma, o aumento contínuo da concentração de 17 $\beta$ -estradiol, produzido pelos folículos em desenvolvimento, induz o comportamento de estro bem como o desencadeamento do processo ovulatório.

### 2.5.3 Intervalo desmame-estro

Segundo Wilson et al. (1986), o fator que mais influencia o número de leitões desmamados/porca/ano é a média de dias não produtivos que a porca apresenta, quando a matriz não está gestante e nem lactante. O intervalo desmame-estro é um período envolvendo dias não produtivos com o maior impacto na média geral destes dias em uma determinada fêmea (Correa et al., 2002).

O intervalo desmama-cio (IDC) corresponde ao período entre o dia da desmama (dia 0) e a nova manifestação do cio. Cerca de 85 a 90% das fêmeas manifestam cio dentro de oito dias após a desmama, embora diversos fatores possam interferir na duração deste intervalo (Poleze, 2004).

Sob condições normais, espera-se que as fêmeas expressem sinais de estro entre 5 e 15 dias pós-desmame (Fahmy, 1981). Com os avanços da suinocultura, o IDE tem sido reduzido ao longo das décadas. Na década

de 80, o IDE era de 11,5 a 20,5 dias (Vesseur, 1997), no início da década de 90 reduziu para 7 a 9 dias (Wilson e Dewey, 1993), e no final da mesma década, para 6 a 8 dias (Koutsotheodoros *et al.*, 1998). Atualmente, o IDE está entre 4 e 6 dias, na maioria das granjas tecnificadas (Vesseur, 1997; Kummer *et al.*, 2003).

Os principais fatores que contribuíram para a redução no IDE, ao longo dos anos, foram alterações na seleção genética, aumento da heterose, alterações nutricionais, sistemas de alojamento e a utilização de hormônios indutores do estro (Vesseur, 1997).

Corrêa et al. (2002) avaliaram o IDC de 184 fêmeas de 1<sup>a</sup> a 4<sup>a</sup> ordens de parto, classificando o IDC em curto (<100 horas), médio (100 a 120 horas) ou longo (>120 horas), e encontraram maior frequência de intervalos curtos (46% das fêmeas), seguido de 29% e 25% de intervalos médios e longos, respectivamente, sendo a média de 124,5  $\pm$  53,4 horas (5,2 dias).

No estudo realizado por Vesseur (1997), envolvendo 2317 coberturas, 0,6% e 67,9% das fêmeas manifestaram estro entre 0 e 3 dias e entre 4 e 5 dias pós-desmame, respectivamente. Poleze *et al.* (2004) avaliaram dados de 7223 coberturas de fêmeas de 1<sup>a</sup> a 5<sup>a</sup> ordens de parto e verificaram que 2,9%, 1,9%, 2,4%, 9,1% e 64,1% das fêmeas avaliadas apresentavam IDE de 0, 1, 2, 3 e 4-5 dias, respectivamente.

Braga (2007) observou que nem a genética, nem a ordem de parto influenciaram as variáveis intervalo desmame-estro (IDE) e duração do estro (DE), encontrando-se um IDE de 83,54  $\pm$  19,59 horas e uma DE de 58,86  $\pm$  10,41 horas.

De acordo com Dial *et al.* (1992), o IDE pode ser influenciado pela duração da lactação, ordem de parto, estação do ano,

nutrição, exposição ao macho pós-desmame, tamanho da leitegada, genética, manejo utilizado e outros como a presença de micotoxinas e doenças.

### **2.5.3.1 Fatores que afetam o intervalo desmame-estro (IDE)**

#### **2.5.3.1.1 Exposição ao macho**

A exposição ao varrão pode ser utilizado após o desmame para estimular o início do crescimento folicular e ovulação, durante a detecção do estro e durante a inseminação, visando otimizar o processo de fertilização (Kemp et al., 2005).

O cortejo do macho suíno doméstico consiste de vários padrões comportamentais, envolvendo o contato nasal, ato de cheirar, esfregar o focinho na lateral e dorso da fêmea, apoiar a cabeça no dorso da fêmea (tentativa de monta) e a monta. Acompanhando esses comportamentos, o macho geralmente urina e faz movimentos de mastigação (Signoret, 1971). A saliva produzida durante o cortejo contém ferormônios que apresentam influência no comportamento da fêmea. Esses ferormônios, principalmente o 5 $\alpha$ -androsteno, são importantes para a indução do reflexo de imobilização da fêmea e para a libido do próprio macho (Perry et al., 1980).

A exposição diária ao macho resulta em menor intervalo desmame-estro, principalmente em fêmeas com intervalos mais longos, tais como as primíparas (Kemp et al., 2005). O papel estimulatório do varrão no início do estro após o desmame pode ser parcialmente explicado por um efeito estimulatório na liberação do LH da glândula pituitária. Imediatamente após o desmame, ocorre, normalmente, um aumento na liberação de LH caracterizado por um aumento na sua frequência, visando-se estimular o crescimento folicular

(Kemp et al., 2005). De acordo com Shaw e Foxcroft (1985), a maior frequência dos pulsos de LH após o desmame resulta em menor intervalo desmame-estro.

O estímulo do macho tem um efeito substancial na expressão do estro em porcas. Soede et al. (1996) relataram que apenas 60% das porcas em estro apresentaram o reflexo de imobilização ao homem na ausência do varrão. A introdução dos estímulos olfatório e auditivo, aumentou esta proporção para 90%; finalmente, estímulos visual e tátil adicionais, resultaram em 100% de expressão do estro em porcas.

Além disso, demonstrou-se que a presença do macho durante a IA, aumenta a concentração plasmática de ocitocina nas porcas e, conseqüentemente, a atividade uterina (Claus e Scharms, 1990). De acordo com Langendijk et al. (2003), a ocitocina estimula a atividade uterina, podendo afetar o processo de transporte espermático no trato genital da fêmea e com isso a fertilização; verifica-se ainda, que a atividade uterina continua elevada por aproximadamente uma hora após o contato com o varrão.

Desta forma, tem sido esclarecedora a importância do macho na estimulação do ciclo estral após o desmame, na detecção do estro e desencadeamento de seus sinais, bem como, no estímulo ao processo de transporte espermático pelo útero. Dentro deste contexto, a utilização do macho desde o desmame até a inseminação é de extrema importância.

#### **2.5.3.1.2 Duração da lactação**

Devido à recuperação gradual do eixo hipotalâmico-hipofisário dos efeitos *feedback* inibitórios da mamada durante a lactação, há geralmente uma relação inversa entre duração da lactação e o subseqüente

intervalo desmame-estro, especialmente, em lactações com menos de 21 dias (Mabry et al., 1996). Portanto, porcas com período de lactação mais curto (por exemplo, <21 dias) quando comparadas às porcas com lactação mais longa (>21 dias) tendem a ter menores duração de estro e intervalo estro-ovulação, devido ao intervalo desmame-estro mais longo.

Segundo Fahmy, (1981) e Koutsotheodoros *et al.* (1998), essa redução do IDE influenciado pela duração da lactação é observado, principalmente, em lactações com menos de 12 dias.

Atualmente, muitas granjas realizam o desmame entre 2 e 3 semanas após o parto. Diversos autores confirmam que períodos de lactação maiores que 17-19 dias resultam em IDE mais curto (Vesseur *et al.*, 1994; Koketsu e Dial, 1997). Por outro lado, lactações consideradas curtas (menores que 14 dias) podem aumentar o período para a manifestação do estro pós-desmame (Vesseur *et al.*, 1994; Almond, 1995).

Costa *et al.* (2004) analisaram 79.729 partos oriundos de 18 granjas e observaram que, tanto em múltíparas quanto em primíparas, a duração da lactação de 8-13 dias resultou no prolongamento do IDE; além disso, observaram que a lactação de 22-25 dias (considerado como desmame tradicional), é a que proporciona os melhores resultados de intervalo desmame-estro, com uma média de 4,3 dias.

### 2.5.3.1.3 Ordem de parto

Geralmente, há uma relação negativa entre ordem de parto e o subsequente intervalo desmame estro (Koketsu e Dial, 1997). Portanto, porcas de ordem de parto 1 e 2 tendem a exibir uma duração do estro e intervalo estro-ovulação mais curtos, quando comparadas às porcas de ordem de

parto  $\geq 3$ , que apresentam um intervalo estro-ovulação mais longo.

De acordo com Fahmy, (1981), o intervalo desmame-estro diminui drasticamente depois do segundo parto e permanece quase inalterado depois do terceiro parto.

Koketsu e Dial (1997) observaram, após análise de um banco de dados com mais de 25.000 registros, que fêmeas de OP 1 apresentaram o IDE mais longo (8,1 dias), enquanto aquelas de OP 2-5 apresentaram um IDE intermediário (5,8 a 5,4 dias).

Maffili *et al.* (2000) avaliaram 9.800 registros de cobertura de fêmeas de OP 1 a 10 e verificaram que a OP influenciou significativamente o IDE. Os autores relataram que primíparas apresentaram o maior IDE (4,94 dias), fêmeas de OP 2 um IDE de 4,47 dias, fêmeas de OP 3-6 um IDE médio de 4,1 dias e as fêmeas com OP >6, um IDE de 3,98 dias ( $P < 0,05$ ).

Aspectos nutricionais podem explicar, em parte, o desempenho inferior no início da vida útil da porca. As primíparas são especialmente susceptíveis ao manejo nutricional, pois além de não terem atingido seu tamanho e peso adultos, apresentam maior demanda nutricional e têm reservas limitadas de proteínas e gorduras corporais (Koketsu e Dial, 1997). Além disso, possuem menor capacidade digestiva, o que interfere na quantidade de alimentos ingeridos durante a lactação, que é um período crítico e determinante para o bom desempenho reprodutivo posterior (Cox et al., 1983; King et al., 1984).

Guedes e Nogueira (2001) investigaram o IDC de primíparas e múltíparas relacionando-o à perda de peso, espessura de toucinho e ingestão alimentar durante os períodos de gestação e lactação. Ao final da gestação, as primíparas perderam espessura de toucinho (4,44%), enquanto as múltíparas ganharam (0,13%). Do final da

gestação até a desmama, esta perda foi maior nas primíparas que nas múltíparas ( $p < 0,02$ ), especialmente na 3ª semana de lactação, para ambos os grupos. O intervalo desmama-cio foi maior ( $p < 0,05$ ) para primíparas (5,55 dias) quando comparado ao das múltíparas (4,22 dias). Estes resultados indicam que as primíparas podem entrar em estado catabólico já no final da gestação, enquanto as múltíparas permanecem em estado anabólico.

#### 2.5.3.1.4 Linhagem das fêmeas

Tanto o intervalo desmame-estro como sua duração apresentam um componente genético, embora sua hereditariedade seja moderada ( $h^2 = 0.20$ ; Rydhmer, 2000).

Há evidências de que a seleção para aumento da taxa de crescimento e redução da espessura de toucinho têm o potencial de aumentar o intervalo desmame-estro, diminuir a duração do estro e a habilidade das leitoas de mostrarem sinais de estro (Rydhmer, 2000).

Vários experimentos que avaliaram a relação intervalo inseminação-ovulação e taxa de fertilização, utilizaram porcas com diferentes genótipos híbridos, e não detectaram, qualquer efeito do genótipo sobre a duração do estro e sobre o intervalo desmame-estro (Kemp e Soede, 1996; Steverink et al., 1997).

Na teoria, a heterose poderia resultar em uma porca com genótipo para maior período de duração de estro, em relação às fêmeas de raça pura. Entretanto, se isso seria ou não um efeito benéfico permanece uma dúvida. Por um lado, duração do estro mais longa poderia aumentar a possibilidade de se detectar a fêmea em estro. Deve-se ressaltar, entretanto, a ocorrência associada de um maior intervalo

estro-ovulação, que diminuiria as taxas de fertilização, caso as inseminações não fossem retardadas.

#### 2.5.4 Duração e período de manifestação do estro

Em geral, a DE média na espécie suína varia entre 50 e 60 horas (Weitze et al., 1994; Soede et al., 1995a), embora possa haver uma grande amplitude para esta característica, como a observada por Soede et al. (2000), de 31 a 65 horas. Um resumo dos resultados de vários trabalhos está apresentado na tabela 5.

O IDE é o fator que mais influencia a variação encontrada para a duração do estro (DE), bem como do intervalo estro-ovulação entre porcas (Soede and Kemp, 1997).

Rojkittikhun et al. (1992) relataram que quando o IDE aumenta de  $\leq 4$  dias para  $\geq 6$  dias, a duração dos sinais de proestro aumentam e a duração do estro diminui.

Weitze et al. (1994) observaram uma redução de 10 horas na duração do estro e de 7 horas no intervalo estro-ovulação para cada dia de aumento no intervalo desmame-estro, entre 3 e 5 dias, e um aumento de 6 horas na duração do estro e de 5 horas no intervalo estro-ovulação à medida que o intervalo desmame-estro aumentou entre 5 e 6 dias.

Entretanto, Kemp and Soede (1996) relataram um aumento de oito horas para a duração do estro e de cinco horas para o intervalo estro-ovulação para cada dia de acréscimo no intervalo desmame-estro, entre 3 e 6 dias.

Tabela 5. Duração do estro (DE), intervalo estro-ovulação (IEO) e momento da ovulação em relação à duração do estro (IEO/DE), em porcas e marrãs

Referência	DE (horas)				IEO (horas)				IEO/DE (%)	
	n	ID	Média	Variação	n	ID	Média	Variação	Média	Variação
<b>Porcas</b>										
Weitze et al. 1994	483	7,7,10h	56,6±14,8	32 a 96	427	7,7,10h	44,6±12,8	24 a 80	74,8±NR	NR
Soede et al. 1994	16	4h	54,0±15,0	24 a 76	16	4h	38,0±11,0	16 a 52	72,0±0,8	54 a 86
Soede et al. 1995a	151	8h	50,0±13,0	24 a 88	151	4h	35,0±8,0	10 a 58	72,0±15,0	39 a 133
Soede et al. 1995b	91	8h	60,0±11,0	32 a 88	91	4h	41,0±8,0	22 a 58	66,5±NR	NR
Mburu et al. 1995	15	4h	56,0±7,9	46 a 73	20	4h	37,0±2,1	35 a 43	68,0±7,7	54 a 78
Dalin et al. 1995	15	4h	47,0±9,2	36 a 68	15	4h	39,0±12,4	20 a 64	83,0±NR	NR
Stokhof et al. 1996	44	8h	57,0±11,0	32 a 88	44	4h	40,0±7,0	22 a 58	70,0±11,0	53 a 106
Nissen et al. 1997	91	8h	60,0±14,0	30 a 89	91	6h	43,0±NR	17 a 70	71,0±14,0	NR
Heck et al. 1997	395	8h	56,56±10,61	32 a 88	395	8h	37,03±10,58	16 a 48	NR	NR
Steverink et al. 1997	115	8h	59,0± 12,0	24 a 88	115	4h	40,1±NR	NR	68,0±10,0	NR
Vianna et al. 1999	236	6h	67,40±12,2	42 a 108	236	7,7,10h	44,23±9,65	23 a 75	69,4±16,41	25,5 a 109,3
Belstra, 2004	501	6h	55,5±12,0	24 a 96	497	6h	42,3±11,3	18 a 78	75,8±12,4	33 a 133
<b>Média</b>			<b>56,6</b>				<b>40,1</b>		<b>71,9</b>	
<b>Marrãs</b>										
Weitze et al. 1990	42	10,14h	50,0±NR	30 a 60	42	10,14h	41,8±8,4	23 a 48	83,6±NR	NR
Almeida et al. 2000	92	6h	52,6±8,6	30 a 72	92	6h	43,9±6,2	30 a 60	85,7±13,8	60 a 138
Bracken et al. 2003	59	12h	58,7±NR	NR	59	6h	33,5±12,3	NR	57,1±NR	NR
<b>Média</b>			<b>53,8</b>				<b>39,7</b>		<b>75,5</b>	

NR= Não relatado pelos autores. ID = Intervalo de detecção do estro e da ovulação; Fonte: Adaptado de Belstra (2004)

Steverink et al. (1999) analisaram por vários meses, os registros de um banco de dados a respeito da duração do estro, detectado duas vezes ao dia, em 55 granjas e encontraram uma redução de cinco horas na duração do estro para cada dia de aumento do intervalo desmame-estro, entre 4 e 6 dias. Entretanto, os autores citam que não houve uma correlação negativa significativa entre a duração do estro e intervalo desmama-estro em 11 das 55 granjas analisadas.

Desta forma, embora haja uma tendência demonstrada pelos trabalhos, de que a duração do estro e do intervalo estro-ovulação sejam reduzidos inversamente proporcional ao aumento diário do intervalo desmama-estro entre 3 a 6 dias, o trabalho

de Steverink et al. (1999) além de outros (Knox and Rodriguez Zas, 2001; Knox et al., 2002), sugerem haver um fator granja-dependente nessa variável.

## 2.6 Inseminação artificial em suínos

A inseminação artificial tem a vantagem de utilizar o potencial genético dos melhores reprodutores em um grande número de fêmeas, facilitando o melhoramento genético do rebanho. Entretanto, a IA na espécie suína não foi amplamente utilizada comercialmente até os anos 80, quando protocolos de inseminação foram padronizados (Crabo, 1990; Johnson et al., 2000).

Atualmente, a IA em suínos utilizando sêmen fresco e resfriado é uma técnica amplamente utilizada no mundo. O estudo mais recente nessa área relatou que 99% das inseminações são realizadas utilizando o sêmen resfriado a 15-20°C (Johnson et al., 2000), sendo 85% dessas inseminações realizadas dentro de 24 horas a partir da coleta do sêmen.

O atual protocolo utilizado para a inseminação em suínos, utiliza a detecção do estro uma ou duas vezes ao dia, de forma que as porcas são inseminadas de duas a três vezes durante o estro. Cada uma dessas inseminações contém cerca de 2,5 a 4,0 bilhões de células espermáticas viáveis por dose, com volumes variando de 80 a 100 mL. As doses de sêmen são depositadas diretamente no segmento médio caudal do cérvix utilizando-se uma pipeta apropriada, que pode ser descartável ou não.

O local de deposição do sêmen, número de espermatozoides por dose, volume de sêmen por dose, momento da ovulação e número de inseminações por estro são os principais fatores que influenciam o atual protocolo de inseminação artificial nos suínos utilizando o sêmen resfriado. Contudo, para ser possível aumentar a eficiência da utilização dos espermatozoides de um simples ejaculado, novas tecnologias têm preconizado a utilização de um menor volume inseminante, associado a uma redução do número de espermatozoides por dose, através de uma mudança do local de deposição do sêmen.

### **2.6.1 Local de deposição do sêmen**

Há basicamente três procedimentos visando a deposição dos espermatozoides diretamente no útero: primeiramente, a deposição cirúrgica dos espermatozoides aproximadamente à 5 cm da junção útero-tubárica (Krueger et al, 1999; Krueger e

Rath, 2000; Rath, 2000); em segundo, a deposição não cirúrgica do sêmen no corpo do útero através de uma pipeta especial, denominada inseminação intrauterina (Gall, 2002; Watson e Behan, 2002; Rozeboom et al., 2004; Bennemann et al., 2004), e por último, a deposição não cirúrgica do sêmen profundamente no corno uterino, utilizando-se um cateter com comprimento especial para esse fim, sendo a técnica denominada de inseminação intrauterina profunda (Martinez et al., 2001; Roca et al., 2003).

#### **2.6.1.1 Técnicas cirúrgicas**

A utilização da técnica cirúrgica em suínos permite a deposição do sêmen próximo à junção útero-tubárica. O número de espermatozoides é reduzido drasticamente para cerca de  $10 \times 10^6$  de células em um volume de apenas 0,5 mL, sem decréscimo do potencial de fertilização quando comparado à IA tradicional usando  $3 \times 10^9$  de espermatozoides em 80 mL de diluidor (Krueger et al. 1999).

Mesmo a laparotomia não sendo um procedimento prático para a inseminação nas granjas comerciais, devido à assepsia necessária em procedimentos cirúrgicos, uma alternativa é a laparoscopia. Essa técnica permite depositar o sêmen diretamente dentro do útero, sendo menos invasiva que a laparotomia. Vazquez et al (2003) obtiveram taxas de gestação acima de 80% utilizando a laparoscopia, com um número reduzido de espermatozoides sexados ( $0,3 \times 10^6$ ) por corno uterino.

Embora gestações já tenham sido descritas utilizando doses com baixas concentrações através de técnicas não cirúrgicas, este procedimento se torna impraticável para uso comercial em suínos (Bathgate et al. 2008).

### **2.6.1.2 Técnicas não cirúrgicas**

#### **2.6.1.2.1 Inseminação Cervical Tradicional (ICT)**

A inseminação artificial intra-cervical é um método consolidado na rotina das granjas e que gera, quando bem empregado, uma ótima eficiência reprodutiva. A inseminação intra-cervical é uma técnica tradicional na espécie suína, que visa fixar a pipeta no cérvix, onde é feita a deposição da dose inseminante, sendo a técnica mais utilizada no mundo. Entretanto, a busca pela otimização da utilização dos reprodutores, através da redução do número de espermatozoides e do volume da dose inseminante, associadas à queda do número de inseminações por estro, tem motivado vários estudos, notadamente no que se refere à substituição da inseminação cervical pela intrauterina ou intrauterina profunda.

De acordo com Bracken et al. (2003), a inseminação cervical, utilizando doses com baixas concentrações, não resulta em fertilidade aceitável, mesmo acompanhada pelo controle do momento da ovulação.

#### **2.6.1.2.2 Inseminação intra-uterina (IIU)**

A IIU é um processo que consiste na deposição dos espermatozoides diretamente no corpo uterino, ao contrário da deposição intracervical, tradicionalmente realizada.

Dallanora (2004), utilizou as técnicas de ICT com  $3 \times 10^9$  de espermatozoides em 90 mL e a IIU com  $1,5 \times 10^9$  em 60 mL, e inseminou 608 fêmeas, não encontrando diferença significativa em nenhum dos parâmetros reprodutivos avaliados.

De acordo com Grossfeld et al (2005), a IIU apresenta resultados similares aos da inseminação cirúrgica, embora um número

muito maior de espermatozoides seja necessário nesta técnica.

Watson e Behan (2002) avaliaram a fertilidade obtida com a IIU, ao utilizarem doses de 1, 2 ou  $3 \times 10^9$  de espermatozoides frescos em doses inseminantes de 80 mL. As fêmeas foram inseminadas no momento da detecção do estro, e novamente, 24 horas após a primeira inseminação. Nesse experimento, não houveram diferenças entre as taxas de parto para as doses com 1 (86,9%), 2 (92,5%) ou  $3 \times 10^9$  (90,5%) de espermatozoides inseminados.

A IIU apresenta-se como ótima alternativa para a utilização do sêmen fresco, substituindo a ICT, pois ao proporcionar a redução do número de espermatozoides/dose, aumenta-se o número de fêmeas inseminadas por ejaculado.

#### **2.6.1.2.3 Inseminação intra-uterina profunda (IIP)**

Na IIP, o sêmen é depositado no terço final de um dos cornos uterinos, aproximadamente à 25 cm da junção útero-tubárica. A IIP é considerada a melhor técnica para utilização do sêmen suíno criopreservado. Um cateter capaz de permitir a IIP utilizando doses com baixas concentrações, sem a necessidade de cirurgia, foi desenvolvido por Martinez et al (2001). A concentração espermática mínima/dose inseminante (sêmen fresco) usando esta técnica foi de  $100 \times 10^6$  de espermatozoides em 5 mL, com taxas de gestação similares às obtidas com as doses controle, de  $3 \times 10^9$  de espermatozoides inseminados transcervicalmente (Martinez et al, 2001).

O cateter flexível tem comprimento de 1,80 metro, diâmetro externo de 4 milímetros e diâmetro interno de 1,8 milímetro. No ato da inseminação, é inserido dentro de uma

pipeta de inseminação espiralada, ultrapassa os anéis cervicais e progride por um dos cornos uterinos, sendo o sêmen depositado tão próximo à junção útero-tubárica quanto possível (Roca et al. 2003).

Martinez et al (2002) demonstraram que quando o sêmen fresco é depositado no fundo de um dos cornos uterinos, utilizando a IIP sem procedimentos cirúrgicos, taxas de parto e tamanho de leitegada normais podem ser obtidos com  $50 \times 10^6$  de espermatozóides, ou seja, 60 vezes menos que as obtidas com doses inseminantes normais. Ao utilizarem o sêmen congelado, Roca et al (2003) demonstraram que doses de  $1 \times 10^9$  de espermatozóides, cinco a seis vezes menores que as normais, através da IIP, podem responder por resultados de fertilidade similares aos obtidos através da ICT, quando utiliza-se  $6 \times 10^9$  de células por dose inseminante.

Doses de  $62,5 \times 10^6$  de espermatozóides com sêmen fresco foram utilizadas sem perda da fertilidade, quando comparada à obtida com inseminação tradicional (Bathgate et al. 2008). Para o sêmen congelado, os autores obtiveram resultados satisfatórios, quando utilizaram uma dose de  $1 \times 10^9$  de espermatozóides ou dupla inseminação com  $250 \times 10^6$ /dose inseminante. Concluíram, ainda, que em fêmeas com ovulação espontânea, uma dupla inseminação seria mais recomendada do que apenas uma inseminação, mais eficaz em fêmeas com ovulação induzida.

Vários trabalhos comparando a IIP com a ICT ( $3 \times 10^9$  de espermatozóides/dose), indicam que a IIP permite uma redução de 20 vezes no número de espermatozóides inseminados, sem afetar a taxa de parto ou tamanho da leitegada em fêmeas com ovulações induzidas por hormônios (Martinez et al, 2002).

Entretanto, estudos usando a IIP em fêmeas sem tratamento hormonal, ou seja, com

ovulação espontânea, indicam que embora as taxas de gestação e de parto não sejam afetadas, o tamanho da leitegada após a IIP com  $150 \times 10^6$  de espermatozóides poderia apresentar um leitão a menos do que após a ICT com  $3 \times 10^9$  de espermatozóides (Day et al., 2003).

## 2.6.2 Momento ideal de inseminação

As taxas de parto e características de leitegada após a inseminação artificial em suínos dependem do momento da inseminação em relação à ovulação (Kemp et al., 1996; Soede et al., 1997). Soede et al. (1995a) enfatizaram que uma boa fertilidade poderia ser obtida quando inseminações contendo  $3 \times 10^9$  de espermatozóides fossem realizadas 24 horas antes da ovulação. Entretanto, a fertilidade máxima ocorreu quando as inseminações foram realizadas 8-12 horas antes da ovulação. Já Nissen et al. (1997) realizaram inseminações com doses inseminantes contendo  $2 \times 10^9$  de espermatozóides e relataram boa fertilidade em porcas inseminadas dentro de 28 horas antes da ovulação e no máximo 4 horas após a sua ocorrência. Resultados similares com leitões foram encontrados, obtendo-se máxima fertilidade quando as inseminações foram realizadas dentro de 24 horas antes da ovulação, com doses inseminantes de  $2 \times 10^9$  de espermatozóides (Waberski et al., 1994b; Waberski et al., 1997).

Steverink et al. (1997) compararam doses inseminantes contendo de 1 a  $6 \times 10^9$  de espermatozóides para a inseminação de porcas, e concluíram que o número de espermatozóides inseminados não afetou o período ideal de cobertura, que é de 24 horas antes da ovulação.

Bracken et al. (2003) avaliaram se uma taxa de fertilização normal em leitões poderia ser alcançada, com uma simples inseminação cervical, associada a um

número reduzido de espermatozoides, respeitando-se um intervalo preciso relativo à ovulação. Foram utilizadas doses inseminantes contendo  $500 \times 10^6$  de espermatozoides, que resultaram em menor número de embriões recuperados e mais oócitos não fertilizados, em relação a um grupo controle, após a lavagem do útero cinco dias após o início do estro. Os autores concluíram que a inseminação cervical com reduzido número de espermatozoides não resulta em uma fertilização aceitável, mesmo quando realizada em momento ideal relativo à ovulação.

Diante do exposto anteriormente, percebe-se que o conhecimento desse período ideal para a inseminação não é suficiente para limitar o número de inseminações para apenas uma em todas as porcas, em virtude do momento da ovulação das porcas, não poder ser previsto dentro de uma variação de 24 horas.

### **2.6.3 Número e intervalo entre inseminações**

As múltiplas inseminações durante o estro é um procedimento padrão utilizado na maioria das granjas, devido a duração relativamente longa do cio, com horários de ovulação muito variáveis do ponto de vista individual e de rebanho. De acordo com Crabo e Dial (1992) uma dupla inseminação aumenta a taxa de parto de 8 a 12% e o tamanho da leitegada em 0,2 leitões, e ainda, uma terceira inseminação pode oferecer uma leve vantagem nos índices reprodutivos (Tilton e Cole, 1982). Na maioria das fêmeas, quando se utilizam duas inseminações, a intervalos de 24 horas durante o estro, uma delas poderá ocorrer suficientemente próxima do momento da ovulação, de forma a garantir o sucesso da fertilização e, conseqüentemente, do desempenho reprodutivo.

Entretanto, Dewey et al. (1995) não encontrou nenhuma associação entre o número de coberturas e o tamanho de leitegada. Além disso, LaPierre (1994), citado por Rozeboom et al. (1997) sugerem que três inseminações, realizadas a intervalos de 24 horas durante o estro, podem ser prejudiciais à fertilidade e aumentar a incidência de descarga vaginal.

Sabe-se que o excesso de sêmen e produtos inflamatórios necessitam ser eliminados do útero para garantir um ambiente uterino adequado antes da descida dos embriões (Pope et al., 1990). Ainda, de acordo com Bower et al. (1974), a contratilidade uterina sofre uma redução drástica ao final do estro, o que dificulta a limpeza ou “*clearance*” uterino.

Segundo Rozeboom et al. (1997), têm sido observada uma redução da fertilidade e do tamanho da leitegada quando a última de múltiplas inseminações é realizada durante o final do estro ou no metaestro. Apesar de existirem relatos de que uma terceira inseminação melhora a performance reprodutiva, os autores mencionados anteriormente demonstraram que uma inseminação ao final do estro, pode de fato, prejudicar a eficiência das inseminações anteriores. Nesse trabalho, leitões e porcas foram inseminadas a intervalos de 24 horas, imediatamente após a detecção do estro, enquanto as fêmeas do grupo controle foram inseminadas apenas uma vez no primeiro dia do estro, quando não apresentavam cio no segundo dia, ou em ambos os dias, se ainda estivessem em cio no segundo dia. As fêmeas do grupo testado foram inseminadas da mesma maneira que as do grupo controle, e então, novamente inseminadas 24 horas após a última IA, independentemente de estarem ou não em estro. A última IA causou uma redução da taxa de parto das fêmeas de ordem de parto 1 e 2 (23 e 22%, respectivamente), bem

como no tamanho da leitegada em 1,1 leitões por leitegada, independentemente da ordem de parto. Além disso, não foram observadas diferenças no tamanho de leitegada e taxa de parto nas fêmeas em estro inseminadas tardiamente, quando comparadas às que estavam em metaestro, no momento da última IA. Os autores relatam, ainda, que os resultados não indicam que três inseminações ou inseminações à intervalos de 24 horas deveriam ser evitadas, mas sim, que a última inseminação não deveria ser realizada durante o final do estro ou metaestro.

Em outro estudo, De Winter et al. (1992) demonstraram que fêmeas suínas inoculadas com bactérias durante o final do estro e metaestro foram mais susceptíveis à infecção uterina que as inoculadas durante o início e meio do estro. Os autores concluíram que a endometrite, presença de corrimento vaginal e menor fertilidade são mais comuns em granjas nas quais as fêmeas são inseminadas tardiamente durante o estro, devido à falhas na sua detecção.

Bortolozzo et al. (2005b) inseminaram leitoas, utilizando doses com  $4 \times 10^9$  de espermatozoides, 12 horas após o início, sendo as inseminações repetidas a cada 12 horas (duas vezes ao dia) ou 24 horas (uma vez ao dia) durante o estro. Os autores não encontraram diferenças entre leitoas inseminadas uma ou duas vezes ao dia para taxa de retorno ao estro e taxa de parto ajustada. Entretanto, leitoas inseminadas apenas uma vez ao dia apresentaram uma redução de 1,2 leitões, quando comparadas com às inseminadas duas vezes.

Com o objetivo de investigar o efeito da frequência de cobrições sobre a fertilidade e tamanho da leitegada de fêmeas suínas, Xue et al. (1998a) realizaram um estudo retrospectivo envolvendo os dados de registro reprodutivo de 20 granjas, durante

um período de sete anos. Foram utilizados, para este fim, 153.936 eventos de cobrição, onde a monta natural foi utilizada. Fêmeas cobertas uma, duas ou três vezes durante o estro foram incluídas no estudo. Os resultados demonstraram que leitoas cobertas apenas uma vez durante o estro, apresentaram as menores taxas de concepção, de parto e de parto ajustada, se comparadas às leitoas cobertas duas vezes. Do mesmo modo, porcas cobertas apenas uma vez, tiveram uma redução nas taxas de concepção, parto e parto ajustada quando comparadas às cobertas duas vezes. Entretanto, não observou-se qualquer diferença nas taxas de fertilidade entre fêmeas cobertas duas ou três vezes durante o estro. O tamanho da leitegada só foi influenciado pela frequência de cobrições em leitoas. As leitoas cobertas uma vez apresentaram menor número de leitões nascidos totais e nascidos vivos em relação às cobertas duas ou três vezes. Por outro lado, não houve diferença entre as cobertas duas ou três vezes, em relação as características de leitegada. Assim, concluiu-se que duplas cobrições, utilizando-se a monta natural, melhoram as taxas de fertilidade, e o tamanho da leitegada em leitoas. Além disso, cobrições triplas durante o estro, não melhoraram as taxas de fertilidade nem o tamanho da leitegada, quando comparadas com as duplas cobrições.

Em outro estudo semelhante, Xue et al. (1998b) avaliaram o efeito da frequência de cobrições sobre a performance reprodutiva de 256 leitoas e 766 porcas, cobertas através de monta natural, uma, duas ou três vezes durante o estro. Os autores demonstraram que leitoas e porcas cobertas três vezes não apresentaram superioridade quanto à taxa de parto e tamanho da leitegada, quando comparadas aos resultados obtidos com cobrições simples ou duplas durante o estro. Para as porcas, não houve diferença nas taxas de parto e tamanho da leitegada, quando cobertas uma

ou duas vezes por estro. Entretanto, leitões cobertas duas vezes durante o estro apresentaram maior tamanho de leitegada que as submetidas a uma única cobrição (9.7 vs 8.6 leitões, respectivamente).

Recentemente, Braga et al. (2009a) inseminaram 70 fêmeas primíparas e multíparas, as quais foram monitoradas quando do início do cio três vezes ao dia, a partir do dia do desmame. As fêmeas em cio na manhã eram inseminadas na noite do mesmo dia, enquanto as apresentando cio à tarde ou à noite eram inseminadas na manhã do próximo dia. O intervalo entre inseminações, da primeira à terceira IA, foi de 12 horas, sendo que as fêmeas só foram

inseminadas pela quarta vez quanto permaneciam em cio por mais que 24 horas após a terceira inseminação. De acordo com os autores, fêmeas submetidas a quatro inseminações artificiais responderam com menor taxa de prenhes, havendo uma redução de 16,45% quando utilizou-se quatro inseminações por estro, como demonstrado na tabela 6. Os autores concluíram que dentro do estabelecido pela literatura, de que as ovulações ocorrem quando transcorridos cerca de 70% da duração do estro, pode ser que muitas inseminações, notadamente a quarta tenha ocorrido em momento inoportuno, do ponto de vista endócrino e conseqüentemente de defesa uterina.

Tabela 6. Efeito do número de inseminações sobre a taxa de prenhes, nascidos totais e vivos de fêmeas suínas

<b>Número de inseminações</b>	<b>Prenhes %</b>	<b>Nascidos Totais</b>	<b>Nascidos Vivos</b>
<b>3 Ias</b>	94,59 (35/37) <sup>a</sup>	13,78 ± 3,67	12,69 ± 3,27
<b>4 Ias</b>	78,13 (25/32) <sup>b</sup>	11,65 ± 3,86	10,43 ± 3,35
<b>Total</b>	86,96 (60/69)	-	-

<sup>a,b</sup> Médias na mesma coluna, seguidas por letras diferentes, diferem (p<0,05).

Atualmente existe uma grande variedade de protocolos envolvendo o momento ideal para realizarem-se inseminações em fêmeas suínas, o que resulta em diferentes médias, no que se refere ao número de inseminações/fêmea coberta.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Localização, período do experimento e dados meteorológicos durante a fase experimental

Os experimentos foram realizados na Fazenda Chuá, pertencente à empresa DanBred do Brasil, localizada no município de Patos de Minas, estado de Minas Gerais, situado a 853 metros de altitude, 18°35'46" de latitude sul e a 46°31'0" de longitude oeste (Instituto de Geociência Aplicada – IGA).

O período experimental compreendeu os meses de junho de 2009 a janeiro de 2010, estando os dados meteorológicos observados durante esse período apresentados na tabela 7.

Tabela 7. Dados meteorológicos médios do período experimental

Ano	Mês	Temperaturas médias (°C)			Precipitação pluviométrica (mm)	Umidade relativa do ar (%)	Insolação (horas/mês)
		Média	Mínima	Máxima			
2009	Junho	18,1	12,7	25,6	55,6	74	230,7
	Julho	19,9	13,7	27,5	0,3	64	281,6
	Agosto	20,9	14,3	27,5	28,9	59	249,3
	Setembro	23,0	17,5	30,0	47,6	66	193,8
	Outubro	22,5	18,2	29,1	85,2	76	136,6
	Novembro	23,8	19,0	30,3	313,5	73	200,3
	Dezembro	22,1	18,4	27,8	367,5	82	119,3
2010	Janeiro	23,4	18,6	29,7	145,3	75	183,0

Fonte: INMET – 5º Distrito de Meteorologia

### 3.2 Delineamento Experimental e animais utilizados

#### 3.2.1 Experimento I: Efeito da fração do ejaculado e do protocolo de resfriamento sobre as características físicas e morfológicas do sêmen de varrões, avaliadas à diferentes períodos de estocagem à 5°C ou 17°C, em contêiner especial

Foram utilizados para esse experimento cinco machos da raça Landrace, pertencentes à Central de Inseminação Artificial da DB-Danbred do Brasil, com idade superior à 12 meses, de fertilidade e qualidade seminal comprovadas após avaliação do desempenho reprodutivo, baseado nos dados de fertilidade do rebanho, e exame andrológico dos mesmos.

Como delineamento experimental, utilizou-se um esquema fatorial 2 x 2, composto por duas frações do ejaculado (Fração 1- primeiros 15 mL da fração rica e Fração 2- restante do ejaculado) submetidos a dois protocolos de resfriamento do sêmen (Tratamento 1- diluidor MR-A e estocagem à 17°C e Tratamento 2- diluidor glicina-gema de ovo e estocagem à 5°C), em contêiner especial. Para tal, utilizaram-se 10 ejaculados dos cinco varrões, coletados a

intervalos de 4 a 6 dias.

Durante o experimento, utilizaram-se coletas fracionadas do sêmen, recebendo os primeiros 15 mL, a denominação de Fração 1 (F1) e o restante do ejaculado denominado de Fração 2 (F2). De cada fração do ejaculado, foram preparadas doses inseminantes submetidas a dois protocolos de resfriamento, envolvendo diferentes diluidores e temperaturas de estocagem, descritas a seguir. Assim, para a avaliação *in vitro*, após cada coleta fracionada, as frações 1 (F1) e 2 (F2) do ejaculado foram sub-divididas e submetidas aos tratamentos a seguir:

- F1T1: fração 1, diluída no diluidor MR-A e armazenada à 17°C em contêiner especial;
- F1T2: fração 1, diluída no diluidor glicina-gema de ovo (Foote, 2002) e armazenada à 5°C em contêiner especial;
- F2T1: fração 2, diluída no diluidor MR-A e armazenada à 17°C em contêiner especial;
- F2T2: fração 2, diluída no diluidor glicina-gema de ovo (Foote, 2002) e armazenada à 5°C em contêiner especial;

Após a avaliação e diluição do sêmen, de ambas as frações coletadas, o mesmo foi resfriado e armazenado a 5 ou 17°C em um contêiner desenvolvido especialmente para a espécie suína (Roner, 2006).

No decorrer da estocagem do sêmen por 72 horas, submeteram-se ambas as frações às avaliações físicas (motilidade e vigor) e morfológicas nos períodos de 0, 12, 24, 36, 48 e 72 horas após a coleta do sêmen.

As amostras foram avaliadas, em diferentes intervalos após o resfriamento, com o objetivo de avaliar o tempo máximo de estocagem do sêmen, sem que ocorresse perda significativa de sua viabilidade. Detalhes da coleta fracionada estão apresentados no item 3.3.2.

### 3.2.2 Experimento II: Fertilidade de fêmeas suínas inseminadas com sêmen oriundo de duas frações do ejaculado, submetidas a dois protocolos de resfriamento à 5°C ou 17°C

No presente experimento, utilizaram-se 40 fêmeas DB-25<sup>®</sup>, de 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> ordens de parto, distribuídas uniformemente após o

agrupamento por ordem de parto (tabela 8), em um esquema fatorial 2 x 2, envolvendo duas frações do ejaculado e dois protocolos de resfriamento do sêmen, em quatro tratamentos, descritos a seguir:

F1T1: fêmeas inseminadas com sêmen da fração 1 do ejaculado, diluído em diluidor MR-A e armazenado à 17°C em contêiner especial (n=10);

F1T2: fêmeas inseminadas com sêmen da fração 1 do ejaculado, diluído em diluidor glicina-gema de ovo (Foote, 2002) e armazenado à 5°C em contêiner especial (n=10);

F2T1: fêmeas inseminadas com sêmen da fração 2 do ejaculado, diluído em diluidor MR-A e armazenado à 17°C em contêiner especial (n=10);

F2T2: fêmeas inseminadas com sêmen da fração 2 do ejaculado, diluído em diluidor glicina-gema de ovo (Foote, 2002) e armazenado à 5°C em contêiner especial (n=10);

Tabela 8. Distribuição das fêmeas por ordem de parto, dentro de cada tratamento

Tratamento	Ordem de Parto		
	3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	Total
<b>F1T1</b>	04 40,00%	06 60,00%	10
<b>F1T2</b>	05 50,00%	05 50,00%	10
<b>F2T1</b>	03 30,00%	07 70,00%	10
<b>F2T2</b>	04 40,00%	06 60,00%	10
<b>Total</b>	16 40,00%	24 60,00%	40 100%

As análises estatísticas referentes à tabela 8, estão apresentadas no anexo IIa do Experimento II (página 196).

As fêmeas deste experimento foram inseminadas com o sêmen dos mesmos

varrões utilizados no Experimento I, sendo os mesmos distribuídos uniformemente quanto ao número de inseminações dentro de cada tratamento (tabela 9), respeitando-se um intervalo médio de três dias entre as coletas de cada macho.

Tabela 9. Frequência de utilização dos reprodutores suínos nas matrizes, quanto ao número de inseminações/tratamento

Varrão	F1T1		F1T2		F2T1		F2T2		Total	
	n <sup>o</sup>	%	n <sup>o</sup>	%	n <sup>o</sup>	%	n <sup>o</sup>	%	n <sup>o</sup>	%
<b>134</b>	04	3,08	05	3,85	07	5,38	05	3,85	21	16,15
<b>17787</b>	09	6,92	06	4,62	08	6,15	07	5,38	30	23,08
<b>22334</b>	04	3,08	07	5,38	06	4,62	08	6,15	25	19,23
<b>38498</b>	07	5,38	05	3,85	06	4,62	06	4,62	24	18,46
<b>38531</b>	08	6,15	09	6,92	06	4,62	07	5,38	33	23,08
<b>Total</b>	32	24,62	32	24,62	33	25,38	33	25,38	130	100,00

As análises estatísticas referentes à tabela 9, estão apresentadas no anexo IIb do Experimento II (página 196).

### 3.3 Procedimentos relacionados ao varrão

#### 3.3.1 Manejo reprodutivo e nutricional

Os machos eram mantidos em uma baia individual com temperatura controlada, recebendo ração duas vezes ao dia com níveis nutricionais específicos para essa categoria, conforme a tabela 10.

Tabela 10. Níveis nutricionais da ração fornecida aos varrões durante o experimento

Níveis nutricionais	Reprodutores
<b>Proteína (%)</b>	16,68
<b>Energia Metabolizável (kcal/kg)</b>	3.100,00
<b>Fibra Bruta</b>	4,57
<b>Cálcio</b>	1,02
<b>Fósforo Total</b>	0,76

#### 3.3.2 Coleta do sêmen

No momento da coleta, os machos eram conduzidos para a gaiola de higienização, onde realizava-se a limpeza da região prepucial, compreendendo o esvaziamento do divertículo prepucial através de pressão mecânica e higienização da região externa do prepúcio com papel toalha. Posteriormente, os machos eram deslocados para a sala de coleta, que continha um manequim fixo com altura regulável, piso aderente e ausência de objetos que pudessem distrair a sua atenção. Assim que o macho saltava sobre o manequim, realizava-se uma nova higienização a seco do prepúcio, utilizando-se papel toalha.

Para a coleta, utilizou-se a técnica de mão enluvada descrita por Hancock e Howell (1959), sendo o sêmen coletado em um recipiente plástico, seco e esterilizado, protegido por recipiente isotérmico, ambos previamente mantidos em estufa a 35-37°C. Visando-se a separação da fração gelatinosa do sêmen, foi acoplado ao recipiente, um papel filtro (filtro descartável®, Minitub do Brasil).

A coleta do sêmen foi realizada de forma fracionada, ou seja, após desprezar-se os primeiros jatos de sêmen, foram coletados os primeiros 15 mL da fração rica em espermatozoides (Fração 1) em um tubo plástico de centrifuga graduado (tipo

Falcon) com capacidade de 50 mL. Acoplado ao tubo, utilizou-se um funil pequeno contendo sobre sua abertura o filtro descartável. Assim que o volume de 15 mL fosse atingido, e a coleta da fração 1 terminasse, o coletador substituiu o tubo por outro recipiente visando-se a coleta do restante do ejaculado (Fração 2). Para a coleta dessa fração, utilizou-se um copo plástico descartável de 500 mL, protegido por um copo isotérmico para reduzir o choque térmico. Nas ocasiões em que ainda houvesse sêmen no funil após a coleta da fração 1, o mesmo era imediatamente colocado sobre o recipiente de coleta da segunda fração, aguardando-se até que todo o conteúdo descesse pelo mesmo, com o objetivo de não perder nenhum volume do ejaculado.

Imediatamente após a coleta, o sêmen era encaminhado ao laboratório, sendo mantido à temperatura de 35-37°C em banho-maria, e avaliado quanto às características físicas (concentração, motilidade e vigor) de ambas as frações; e ainda, nesse momento, era retirada uma alíquota de sêmen de cada fração, devidamente diluída e conservada em solução de formol-salina para posterior avaliação da morfologia espermática.

### 3.3.3 Avaliação física do sêmen

Após a coleta, o sêmen foi avaliado quanto ao seu aspecto e classificado em soroso, soroso-leitoso ou leitoso. O volume da Fração 2 foi determinado através da pesagem em balança digital, considerando-se que cada grama de sêmen corresponde ao volume de um mL.

Para a análise da concentração espermática, uma amostra de sêmen de cada fração foi retirada e diluída em solução de formol-salina tamponada (Hancock, 1957). Baseando-se nas concentrações observadas em cada fração, durante a realização de um pré-experimento, padronizou-se que devido

à alta concentração de espermatozoides por mililitro de sêmen encontrada na fração 1, a mensuração de sua concentração seria realizada retirando-se uma alíquota de 10 µl de sêmen com auxílio de uma pipeta graduada, a ser diluída em 8 mL de uma solução formol-salina tamponada, à uma taxa de diluição de 1:800. Para a mensuração da concentração espermática da Fração 2, utilizou-se uma alíquota de 40 µl de sêmen diluída em 4 mL da solução de formol-salina tamponada, a uma taxa de diluição de 1:100. Para ambas as frações, realizou-se a contagem das células espermáticas em hematocítômetro (Câmara de Neubauer). Assim, após a homogeneização da solução, preenchia-se os dois lados da câmara, aguardando-se um período de cinco minutos em repouso para uma adequada sedimentação das células espermáticas. Então, realizava-se a contagem em microscópio óptico, com aumento de 400x. O valor médio encontrado após a contagem de cinco quadrados, na diagonal, nos dois lados da câmara, era então multiplicado por uma constante de  $40 \times 10^6$  para a Fração 1, e de  $5 \times 10^6$  para a Fração 2, visando-se obter o número de células espermáticas por mL de sêmen. Quando a diferença entre as contagens dos dois lados da câmara ultrapassava os 10%, realizava-se um novo procedimento.

Para avaliação da motilidade e vigor, colocou-se uma gota de sêmen entre lâmina e lamínula, previamente aquecidas em mesa aquecedora a 37°C, sendo submetida imediatamente à avaliação microscópica de campo claro, com aumento de 100X e 400X, sendo a motilidade expressa em percentual de células móveis/campo (0 - 100). Para avaliação do vigor espermático foi utilizado uma escala subjetiva de 0 a 5, baseando-se na velocidade de deslocamento das células espermáticas nos campos avaliados, recebendo 0 as células imóveis e cinco as com grande rapidez de

movimentação. Na mesma amostra, observou-se o número de aglutinações encontradas por campo, utilizando-se uma escala de 0 a 3. Assim, foi atribuído o valor 0 para ausência de aglutinação, e valores de 1, 2 e 3 para um número de aglutinações de 1 a 2, 3 a 5 e acima de 6 por campo, respectivamente.

Para as avaliações morfológicas espermáticas, a serem realizadas posteriormente, retirou-se amostras de sêmen, devidamente acondicionadas em solução formol salina tamponada. As análises morfológicas foram realizadas em microscópio óptico com contraste de fase (1000X), sendo uma gota da solução depositada em uma lâmina, cuidadosamente coberta por lamínula. O exame de cada amostra constituiu-se da observação morfológica de 100 células espermáticas (Shiple, 1999), localizadas em diversos campos ao longo de toda a lâmina, quando investigou-se a percentagem de espermatozóides normais e com patologias de cabeça, peça intermediária, cauda, acrossoma, gota proximal, gota distal e defeitos totais (CBRA, 1998).

### 3.3.4 Processamento do sêmen

#### 3.3.4.1 Diluição do sêmen

Para a diluição do sêmen, considerou-se a concentração espermática por mL de cada fração, multiplicada pela motilidade encontrada, visando-se obter o número de células viáveis por mL. Como utilizou-se uma dose padrão de  $3 \times 10^9$  de espermatozóides móveis diluídos em um volume de 100 mL, dividiu-se o valor de  $3 \times 10^9$  pela quantidade de células viáveis por mL de sêmen, encontrando-se assim, o volume de sêmen necessário por dose inseminante. Para o cálculo do volume de diluidor necessário em cada dose, subtraiu-se do volume total da dose inseminante (100 mL), o volume de sêmen necessário

para uma concentração espermática de  $3 \times 10^9$  de espermatozóides móveis/dose.

Novamente, baseando-se nos resultados de um pré-experimento, verificou-se a necessidade de uma pré-diluição imediata da Fração 1, devido a alta concentração espermática por mL encontrada na mesma. Desta forma, assim que essa fração chegava ao laboratório, realizava-se os procedimentos para mensuração da concentração e coleta de uma amostra para exame morfológico, após o que a mesma era rapidamente sub-dividida em dois tubos, com volumes iguais de 7,5 mL. A seguir, o sêmen presente em ambos os tubos era submetido à uma pré-diluição, quando adicionava-se em um tubo, um volume de 22,5 mL de diluidor MR-A, e no outro, volume igual de diluidor glicina-gema de ovo, perfazendo-se uma diluição de 1:3 (sêmen:diluidor). O sêmen pré-diluído era mantido em banho-maria a 35-37°C até a mensuração da concentração espermática e os cálculos para preparação de cada dose inseminante. Para a Fração 2, não realizou-se a pré-diluição.

Para ambas as frações, preparou-se doses dos diferentes tratamentos dentro da mesma fração do ejaculado. Desta forma, após o cálculo do volume de sêmen necessário para preparação de cada dose, tanto para a Fração 1 como para a Fração 2, as doses inseminantes eram preparadas diretamente em cada uma das bisnagas plásticas (100 mL). Para isto, no momento da preparação das doses, colocava-se um volume de diluidor aquecido à 35-37°C, variando de 30 a 50 mL, em cada uma das bisnagas, dependendo do tratamento, às quais adicionava-se posteriormente, o volume de sêmen necessário para produzir uma dose inseminante de  $3 \times 10^9$  de espermatozóides móveis. Em seguida, a bisnaga era completada com o diluidor, até atingir o volume de 100 mL. Todas as bisnagas eram corretamente identificadas antes do envase do sêmen, sendo anotados o número do

macho, data e o tratamento ao qual pertenciam.

Imediatamente após o envase, as doses foram submetidas a dois protocolos de resfriamento. As doses inseminantes foram acondicionadas dentro do contêiner, especificamente, dentro dos blocos menores, atingindo as temperaturas de manutenção desejadas, por meio de aberturas laterais, do bloco central e dos blocos menores, permitindo a troca de calor/frio entre as bisnagas e a unidade refrigeradora. As doses preparadas com o diluidor glicina-gema de ovo eram mantidas em contato direto com a unidade refrigeradora, por um período de 4 horas. Por outro lado, as preparadas com o diluidor MR-A foram assim mantidas por 2 horas. Após esse período, os blocos menores que continham as doses, eram girados, de forma a permanecer isolados do bloco refrigerador

por 1 cm de isopor, para as doses diluídas em glicina-gema de ovo, as quais desejava-se uma temperatura de 5°C. O mesmo procedimento foi adotado nos blocos com as doses diluídas no diluidor MR-A, sendo os mesmos girados, mantendo-se a distância de 5,5 cm do bloco refrigerador, onde pretendia-se manter a temperatura de 17°C.

### 3.3.4.2 Preparação dos diluidores

Utilizou-se nos experimentos I e II, os diluidores MR-A<sup>®</sup> e o glicina-gema de ovo (Foote, 2002), sendo que o MR-A<sup>®</sup>, por motivos comerciais, não apresenta fórmula aberta. Entretanto, a composição do diluidor glicina-gema de ovo está apresentada na tabela 11.

Tabela 11. Composição do diluidor Glicina-gema de ovo (Foote, 2002)

<b>Componentes</b>	<b>Glicina-gema de ovo</b>
<b>Glicose Anidra (g)</b>	10,0
<b>Citrato de Sódio (g)</b>	3,3
<b>Glicina (g)</b>	3,3
<b>Penicilina (U.I)</b>	1.000.000
<b>Estreptomicina (g)</b>	1
<b>Gema de ovo (mL)</b>	200
<b>Água (mL)</b>	800
<b>pH</b>	6,82
<b>Osmolaridade</b>	217

Para a preparação dos diluidores, utilizou-se água miliQ (água do tipo I), autoclavada e armazenada em frascos plásticos de 2 litros hermeticamente fechados. Quando de sua utilização, a água era aquecida em banho-maria a 37°C, visando-se uma melhor dissolução dos componentes.

No caso do diluidor MR-A<sup>®</sup>, diluía-se um sachê do produto em 1 litro de água seguindo a recomendação do fabricante. Após a completa dissolução dos componentes, o mesmo era mantido em banho-maria a 35-37°C até o momento da diluição do sêmen.

Para a preparação do diluidor glicina-gema de ovo, inicialmente pesava-se todos os ingredientes utilizando-se uma balança digital, com exceção da penicilina. Em seguida, adicionava-se aos ingredientes água q.s.p. 800 mL, além do volume de penicilina indicado. Finalmente, após a completa homogeneização e dissolução dos componentes, adicionava-se um volume de 200 mL de gema de ovo.

Nas ocasiões em que não houvesse necessidade da preparação de 1 litro do diluidor glicina-gema de ovo, utilizava-se uma quantidade proporcional dos ingredientes para preparar o volume desejado naquele momento.

Quanto à obtenção da gema de ovo, utilizou-se sempre ovos de galinha, dentro de um a cinco dias da postura. Visando-se diminuir os riscos de contaminação, os ovos eram lavados com água corrente e sabão neutro, e posteriormente higienizados com álcool antes de sua utilização. Os ovos eram então quebrados, procurando-se eliminar toda a clara, incluindo a secagem da gema em um papel filtro circular de 11 cm de diâmetro, próprio para o procedimento. Assim que a gema apresentava-se sem resíduos da clara, era furada, sendo todo o conteúdo da mesma transferido para uma proveta, descartando-se a membrana protetora da gema, até atingir o volume desejado. Sempre que o conteúdo da gema era extravasado no filtro, antes da completa secagem, a mesma era então descartada.

Após a adição da gema de ovo ao restante da solução preparada, procurava-se homogeneizar o diluidor com o auxílio de um bastão de vidro por cerca de um minuto, até a completa dissolução da gema. Em seguida, avaliava-se uma gota do diluidor pronto, entre lâmina e lamínula em microscópio a 100x, visando-se observar a completa dissolução dos glóbulos de gordura da gema de ovo.

### **3.3.4.3 Resfriamento e armazenamento do sêmen**

Para o resfriamento, utilizou-se um contêiner desenvolvido especialmente para o resfriamento e conservação do sêmen suíno, e que apresenta uma taxa de resfriamento controlada de 37°C para temperaturas de 17 ou 5°C (Roner, 2006).

O contêiner constitui-se de três blocos de isopor: um bloco compacto formando o fundo; um bloco central com perfurações para colocação dos blocos menores, contendo os frascos plásticos que acondicionam o sêmen diluído a ser resfriado, e uma perfuração central para colocação do sistema refrigerador, havendo, ainda um bloco com função de tampa. O bloco central do contêiner, formado de seis blocos menores, possui perfurações laterais para colocação das bisnagas plásticas, que se movimentavam em torno do bloco central, permitindo atingir a temperatura de  $17 \pm 1^\circ\text{C}$  ou  $5 \pm 1^\circ\text{C}$ . Cada bloco comporta duas bisnagas de 100 mL, totalizando 12 doses por contêiner.

Baseando-se nas curvas realizadas durante a montagem do contêiner em vários pré-experimentos, ficou estabelecida a distância de 5,5 cm do bloco refrigerador, para os blocos menores, visando-se a manutenção da temperatura de  $17 \pm 1^\circ\text{C}$ , e de 1cm, para a de  $5 \pm 1^\circ\text{C}$ . Por meio de aberturas laterais, do bloco central e dos blocos menores, ocorre troca de calor/frio entre os frascos e o sistema refrigerador, obtendo-se taxas de resfriamento controladas.

O sistema refrigerador do contêiner constituiu-se de cilindro fechado nas suas extremidades, confeccionado a partir de uma liga de latão/alumínio. Esse cilindro foi revestido por tela de arame, com a função de manter o contato homogêneo das doses com o sistema refrigerador. O interior do cilindro foi preenchido com 1,6 litros de

gelo reciclável e mantido em congelador, por no mínimo 12 horas, antes da sua utilização.

De acordo com Roner (2006), após as doses de sêmen serem introduzidas no contêiner, a taxa de resfriamento inicial de 37°C para 17°C, é de -0,16°C/min até atingir a temperatura de 17°C e de -0,17°C/min até 5°C, sendo que na temperatura de choque térmico, entre 17°C a 8°C, foi de -0,0049°C/min.

#### **3.3.4.4 Avaliação do sêmen resfriado**

Após a preparação das doses para o resfriamento, realizou-se a primeira avaliação do sêmen antes das mesmas serem colocadas no contêiner, considerando-se esta avaliação como controle (0 hora).

Para o Experimento I, foram realizadas avaliações seriadas do sêmen, nos intervalos de 12, 24, 36, 48 e 72 horas após o início do processo de resfriamento. Dessa forma, objetivou-se encontrar um tempo máximo de resfriamento do sêmen, sem que ocorresse perda significativa de sua viabilidade.

Para a avaliação do sêmen nos diferentes intervalos de tempo, evitou-se a abertura do contêiner para que não ocorresse elevação da temperatura no interior do mesmo. Para isto, pequenos orifícios foram perfurados em posições estratégicas na tampa do contêiner, nos quais foram introduzidas sondas uretrais (n° 06) para dentro do mesmo, dirigidas, em seguida, para dentro das bisnagas plásticas, cujas extremidades das tampas foram previamente cortadas. Posteriormente, atentando-se para que as sondas não saíssem de dentro das bisnagas, a tampa era colocada cuidadosamente em sua posição. Finalmente, uma fita adesiva era passada em toda a circunferência do contêiner, envolvendo o encontro do corpo

com a tampa, evitando-se assim o movimento da mesma. No momento preconizado das avaliações, uma seringa de 20 mL era acoplada na sonda uretral visando-se a retirada de uma amostra, de aproximadamente 3 mL do sêmen diluído para avaliação. Entretanto, antes da retirada da amostra, com o intuito de homogeneizar o sêmen e ressuspender os espermatozoides, lentamente, a seringa era cheia e esvaziada novamente, realizando-se esse procedimento cerca de cinco vezes. Com exceção da avaliação de 12 horas, a primeira após o fechamento do contêiner, em todas as outras avaliações, retirou-se um volume de cerca de 2 mL antes de se iniciar a homogeneização, sendo esse sêmen descartado, visando-se eliminar um provável sêmen residual que tenha permanecido na sonda após a avaliação anterior.

Para o Experimento II, antes das inseminações, realizou-se uma nova avaliação das doses inseminantes. Assim, o contêiner era aberto dentro do laboratório resfriado com ar condicionado, sendo as doses a serem utilizadas naquele momento retiradas; nas ocasiões em que fosse necessária a manutenção de alguma dose dentro do contêiner, o mesmo era novamente fechado e lacrado. Após a retirada das doses, as mesmas eram corretamente homogeneizadas, sendo as bisnagas abertas para retirada de uma amostra de cerca de 3 mL do sêmen.

As amostras retiradas para as avaliações, eram transferidas para um tubo Ependorff, quando eram aquecidas em banho-maria a 37°C por cerca de 5 a 8 minutos para o sêmen a 17°C diluído em MR-A, e por cerca de 10 minutos para o sêmen a 5°C diluído em diluidor de glicina-gema de ovo. Em seguida, retirava-se uma gota, colocada entre lâmina e lamínula pré-aquecidas a 37°C, para avaliação da motilidade e vigor

em microscópio óptico, com aumentos de 100 e 400x.

Além disso, foram retiradas amostras de cada tratamento, devidamente diluídas em solução de formol-salina, para posterior avaliação morfológica dos espermatozoides.

Para a avaliação física das amostras de sêmen diluídas em glicina-gema de ovo, utilizou-se uma solução clarificante de citrato de sódio a 5%, colocando-se uma gota de sêmen e uma gota da solução entre lâmina e lamínula.

### 3.4 Procedimentos relacionados às fêmeas

#### 3.4.1 Manejo reprodutivo e nutricional

Todas as fêmeas selecionadas para o experimento foram inspecionadas ainda na maternidade, quando eram anotados os números dos brincos, ordem de parto, condições clínicas e o dia previsto do desmame. Cerca de dois dias antes do desmame, as fêmeas eram marcadas na

região dorsal com uma letra T (teste) utilizando-se um bastão de marcação vermelho. Dessa forma, todas as fêmeas ao desmame apresentando a marcação, eram direcionadas para um mesmo galpão de gestação, de forma a facilitar o manejo no experimento.

O desmame das fêmeas, ocorreu em média aos 21 dias de lactação, sendo que o mesmo era realizado em lotes, às segundas, quartas e sextas-feiras, sempre pela manhã, aproximadamente às 8:00 horas. As fichas individuais eram transferidas da maternidade para a gestação juntamente com as respectivas fêmeas, sendo anotado o dia do desmame e o tratamento a que pertenciam.

No período caracterizado como intervalo desmame-cio (IDC), as fêmeas foram alimentadas com a ração de lactação à vontade. As fêmeas que apresentavam cio e iniciavam as inseminações, passavam a receber 2,0 kg de ração de gestação. As especificações nutricionais de cada ração fornecida estão apresentadas na tabela 12.

Tabela 12. Níveis nutricionais das rações utilizadas pelas fêmeas durante o experimento

Níveis nutricionais	Tipos de Ração	
	Lactação	Gestação
Proteína (%)	19,02	14,45
Energia Metabolizável (kcal/kg)	3.400,00	2.850,00
Fibra Bruta (%)	3,75	5,35
Cálcio (%)	1,00	0,95
Fósforo Total (%)	0,73	0,82

#### 3.4.2 Intervalo desmame-estro, manifestação e duração do estro

A detecção do estro foi realizada três vezes ao dia (8:00, 15:00 e 20:00h), inclusive no dia do desmame, através do contato das

fêmeas com um varrão maduro, sendo a fêmea estimulada por contato focinho-focinho com o varrão. Concomitantemente, aplicava-se pressão sobre seu dorso e flanco, quando avaliava-se o reflexo de tolerância ao homem, na presença do varrão. Considerou-se como início do cio o

momento em que as fêmeas permitiram que o investigador sentasse sobre o seu dorso por algum tempo, sem sinal de recusa, como proposto por Willemse e Boender (1966).

Um teste de observação de cio era realizado, assim que as fêmeas eram transferidas da maternidade após o desmame e alojadas no setor de gestação. As fêmeas que eram observadas em cio logo que chegavam ao setor de gestação, não foram utilizadas para o experimento, pela impossibilidade de se identificar o momento real do início do estro. Desta forma, só foram utilizadas as fêmeas que apresentaram no mínimo uma observação negativa de estro após serem alojadas no setor de gestação.

Para fins de cálculo da duração do estro, considerou-se como o seu início, o intervalo médio entre a primeira aceitação da monta pelo homem, na presença do varrão e a última não aceitação. Mesmo após a última inseminação, as fêmeas continuavam tendo o cio observado, até que não aceitassem mais a monta. Finalmente, considerou-se como final do cio, o intervalo médio entre a última aceitação da monta pelo homem na presença do varrão e a primeira não aceitação.

Foram registrados também, os horários das manifestações do estro ao longo do dia, sendo os mesmos classificados como 1- matutinos (8:00h), 2- vespertinos (15:00h) e 3- noturnos (20:00h).

### **3.4.3 Inseminação Artificial e rufiação de retorno ao cio**

O esquema de inseminação utilizado obedeceu ao seguinte protocolo: as fêmeas em cio pela manhã, foram inseminadas na noite do mesmo dia, enquanto as apresentando cio à tarde (15:00) ou à noite (20:00) foram inseminadas na manhã do

próximo dia. O intervalo entre inseminações foi de aproximadamente 12 horas, da primeira até a terceira inseminação, sendo que as fêmeas que ainda persistiam em cio 24 horas após a terceira inseminação, recebiam uma quarta dose, sendo este um protocolo normalmente utilizado pela empresa.

Todas as inseminações foram realizadas pelo mesmo inseminador, utilizando-se a técnica tradicional de deposição do sêmen intracervical, com doses inseminantes de  $3 \times 10^9$  de espermatozóides móveis. No momento da inseminação, o rufião era colocado no corredor externo, permanecendo diante das fêmeas, de forma a estabelecer contato naso-nasal com as mesmas, desencadeando o reflexo de tolerância ao homem, na presença do macho. Foram inseminadas no máximo três fêmeas de cada vez, sendo o macho deslocado de posição, posteriormente, de forma a cobrir o espaço das próximas três fêmeas.

Visando-se simular a monta do macho sobre as fêmeas, no momento da inseminação, utilizou-se uma sela de aproximadamente 10 kg, colocada sobre o dorso da fêmea. À seguir, com auxílio de papel toalha descartável, efetuava-se a higienização da genitália externa, quando a pipeta de inseminação, previamente lubrificada com uma pequena fração do sêmen diluído era introduzida no sentido dorso-cranial e girada no sentido anti-horário em direção ao cérvix, até sua completa fixação. Foram utilizadas para as inseminações, pipetas do tipo Melrose<sup>®</sup>, esterilizadas e embaladas individualmente.

Após a homogeneização do sêmen, utilizando-se movimentos suaves, visando ressuspender os espermatozóides, as bisnagas eram acopladas na pipeta e presas à sela. O tempo de cada inseminação, compreendendo o tempo necessário para

que todo o conteúdo da bisnaga fosse eliminado por gravidade, foi cronometrado e registrado. Na presença de muito ar no interior da bisnaga, dificultando a aspiração do sêmen, retirava-se o mesmo através do desacoplamento da bisnaga e novo acoplamento à pipeta, imediatamente após sua retirada. Durante a inseminação, foram realizados movimentos e pressão no flanco e no dorso da fêmea visando aumentar o estímulo da mesma. Ao fim da inseminação, a pipeta era retirada através de movimentos giratórios no sentido horário.

O diagnóstico de gestação foi realizado pela rufiação de retorno entre 17 e 30 dias pós-cobertura observando-se o reflexo de imobilidade das fêmeas, similarmente ao procedimento anteriormente descrito para o diagnóstico do cio.

#### **3.4.4 Eficiência reprodutiva**

Todas as fêmeas foram acompanhadas até o parto, sendo anotados eventuais corrimentos, abortos, mortes e descartes involuntários.

Foram analisadas a taxa de gestação através da taxa de não retorno ao estro, taxa de parto, número de leitões nascidos, nascidos vivos, natimortos e mumificados.

#### **3.5 Análises Estatísticas**

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente ao acaso, sendo a ordem de parto o critério para a formação dos grupos para o sorteio entre as fêmeas. Para ambos os experimentos, utilizou-se um esquema fatorial 2 x 2 incluindo duas frações do ejaculado (F1 e F2) e dois protocolos de resfriamento (T1-MR-A à 17°C e T2-glicina-gema de ovo à 5°C) do sêmen. Desta forma, o modelo experimental envolveu o efeito da fração e do protocolo de resfriamento, bem como a interação entre fração e protocolo. Os Experimentos I e II, tiveram como pontos finais a

manutenção das características físicas do sêmen (Experimento I) ou a fertilidade de fêmeas suínas inseminadas (Experimento II).

No Experimento I, para as comparações da motilidade e vigor espermáticos entre os tratamentos, nos diferentes períodos de estocagem, utilizou-se como fontes de variação, no modelo estatístico para análise de variância, o diluidor, a fração, o tempo, e as interações entre diluidor/fração, diluidor/tempo, fração/tempo e diluidor/fração/tempo.

Os dados proporcionais (taxa de gestação e taxa de parto) foram avaliados por distribuição de frequência e aplicado o teste de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ), para a detecção de eventuais diferenças entre as variáveis avaliadas. Os dados quantitativos (IDC, DE, intervalos do início do cio à 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> IA, intervalos da colheita do sêmen à 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> IA, intervalo última IA ao final do cio, número de IAs, número de nascidos totais, número de nascidos vivos, número de natimortos e número de mumificados) foram submetidos ao procedimento GLM (General Linear Models), sendo as médias comparadas pelo teste SNK (Student Newman Keuls) quando da comparação de três ou mais médias, ou pelo teste t de Student, para a comparação de duas médias. Tanto no Experimento I quanto no Experimento II, os dados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média.

As características avaliadas subjetivamente como motilidade e vigor espermático pré e pós-resfriamento, foram avaliados pela abordagem não-paramétrica, aplicando-se o teste de Kruskal-Wallis.

Os dados correspondentes às avaliações morfológicas dos espermatozoides expressos em percentagem, sofreram uma transformação angular ( $\arcsen \sqrt{x}$ ), sendo as

médias comparadas pelo teste SNK (Student Newman Keuls).

Todas as análises foram processadas pelo programa estatístico Statistical Analysis System, versão 5 - Microsoft® (SAS, 1999), sendo o nível de significância adotado de 95% ( $p < 0,05$ ).

#### **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

##### **4.1 EXPERIMENTO I: Efeito da fração do ejaculado e do protocolo de resfriamento sobre as características físicas e morfológicas do sêmen de varrões, avaliadas à diferentes períodos de estocagem à 5°C ou 17°C, em contêiner especial**

###### **4.1.1 Características do sêmen e desempenho reprodutivo dos varrões**

Neste experimento, foram utilizados 10 ejaculados de cinco varrões (2 ejaculados/macho), estando os dados referentes às características físicas e desempenho reprodutivo, correspondentes a cada fração do ejaculado, apresentados na tabela 13.

Observa-se na tabela 13 que o volume médio coletado na fração 2, correspondendo ao restante do ejaculado após a coleta dos 15 mL da fração 1, foi de 208,98 mL, indicando que o volume total dos ejaculados coletados no presente experimento, está dentro dos padrões estabelecidos entre 150 a 300 mL (Pinart et al., 1999).

De acordo com os valores apresentados, observa-se que não houve diferenças entre as frações no que diz respeito à motilidade do sêmen a fresco ( $p > 0,05$ ), estando os valores (74,5% para ambas as frações) dentro do estabelecido como critério mínimo para o processamento de um ejaculado, como proposto anteriormente, de 60% (Flowers, 1997; Johnson et al., 2000).

Quanto ao vigor espermático, observa-se que a fração 1 apresentou um valor médio superior ( $p < 0,05$ ) ao encontrado na fração 2. Contudo, os valores encontrados nas duas frações nesse experimento, são bem superiores ao valor mínimo preconizado para que um ejaculado seja utilizado (Silveira e Iais, 1999). Além disso, os mesmos autores citam que se deve desprezar ejaculados apresentando vigor espermático abaixo de três, em uma escala de 0 a 5.

Como esperado, o número de espermatozoides por mL diferiu ( $p < 0,05$ ) entre as duas frações coletadas. Para a fração 1, a concentração espermática média foi de  $1692 \times 10^6$  de espermatozoides por mL, enquanto na fração 2 foi de  $246 \times 10^6$  de espermatozoides por mL de sêmen. Obviamente, a concentração espermática encontrada na fração 2 apresentou-se abaixo do que normalmente observa-se para a fração rica do ejaculado, de 500 a  $1000 \times 10^6$  de espermatozoides/mL (Garner e Hafez, 1996) ou mesmo para o ejaculado total (fração rica e pós-espermática), como demonstrado por Braga (2007), de  $386,18 \times 10^6$  de espermatozoides/mL, após a realização de 27 coletas de sêmen.

Tabela 13. Características físicas do sêmen e desempenho reprodutivo dos varrões utilizados no Experimento I, de acordo com a fração do ejaculado utilizada

Parâmetros avaliados	Fração do ejaculado	
	Fração 1 (15 mL)	Fração 2 (restante)
Número de varrões	05	05
Número de ejaculados	10	10
Volume do sêmen (mL)	15,00 ± 0,0	208,98 ± 11,52
Motilidade do sêmen a fresco (%)	74,50 ± 1,17	74,50 ± 1,17
Vigor do sêmen a fresco (0 – 5)	4,70 ± 0,11 <sup>a</sup>	4,30 ± 0,13 <sup>b</sup>
Nº de spz/mL (x10 <sup>6</sup> )	1692,00 ± 184,95 <sup>a</sup>	246,00 ± 26,54 <sup>b</sup>
Nº de spz móveis/mL (x10 <sup>6</sup> )	1271,60 ± 148,88 <sup>a</sup>	185,56 ± 22,81 <sup>b</sup>
Nº de spz totais/fração (x10 <sup>9</sup> )	25,38 ± 2,77 <sup>a</sup>	49,72 ± 4,29 <sup>b</sup>
Nº de spz móveis/fração(x10 <sup>9</sup> )	19,08 ± 2,24 <sup>a</sup>	37,38 ± 3,79 <sup>b</sup>
Volume de sêmen/dose inseminante (mL)	2,76 ± 0,42 <sup>b</sup>	18,22 ± 1,97 <sup>a</sup>
Volume de diluidor/dose inseminante (mL)	97,24 ± 0,42 <sup>a</sup>	81,78 ± 1,97 <sup>b</sup>
Nº potencial de fêmeas inseminadas	6,36 ± 0,75 <sup>b</sup>	12,45 ± 1,26 <sup>a</sup>
Tempo da colheita à pré-diluição (min)	3,80 ± 0,20	-
Tempo da colheita à diluição (min)	16,50 ± 0,96	16,90 ± 1,50
Tempo da colheita ao resfriamento (min)	45,50 ± 2,54 <sup>a</sup>	37,40 ± 2,37 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Médias seguidas por letras diferentes, na mesma linha, diferem (p < 0,05)

As análises estatísticas referentes à tabela 13, estão apresentadas no anexo Ia do Experimento I (páginas 166 e 167).

Para a fração 1, Saravia et al. (2010) trabalhando com os primeiros 10 mL da fração rica, relataram uma concentração média para essa fração de 1600 x 10<sup>6</sup> de espermatozoides/mL, ou seja, um pouco inferior à encontrada nesse experimento, considerando-se os 15 primeiros mL do ejaculado. Os autores citam ainda, que os espermatozoides presentes nesses primeiros 10 mL (16 x 10<sup>9</sup> de espermatozoides) representaram 23,4% do número total médio de espermatozoides encontrados na fração rica do ejaculado, que constituiu-se de 68,4 x 10<sup>9</sup> de espermatozoides. Comparativamente, os dados encontrados nesse experimento, demonstram que a Fração 1 continha cerca de 25 x 10<sup>9</sup> de espermatozoides totais, nos primeiros 15 mL da fração rica, e não nos 10 mL iniciais, como relatado por Saravia et al. (2010). Para a fração 2, os autores consideraram apenas o restante da fração rica, diferentemente desse experimento, no qual considerou-se como fração 2 o restante do ejaculado total (restante da fração rica e

fração pós-espermática). Contudo, vale salientar que os autores relataram um valor médio de 57 x 10<sup>9</sup> de espermatozoides na fração 2, superior ao encontrado aqui de 49 x 10<sup>9</sup> de espermatozoides, embora considerando-se os diferentes volumes de sêmen utilizados entre os dois protocolos. Possivelmente, essa diferença se deu pelo valor médio de espermatozoides encontrados no ejaculado total entre os estudos, de 87 x 10<sup>9</sup> no estudo de Saravia et al. (2010) e de 75 x 10<sup>9</sup> de espermatozoides, no presente experimento. Vale ressaltar, que de acordo com os valores de concentração encontrados nesse estudo, a fração 1 (primeiros 15 mL da fração rica) representou 33,8% do total de espermatozoides presentes no ejaculado, o que demonstra a alta concentração espermática dessa fração, notadamente quando considera-se a grande diferença de volume, entre as duas frações (15 vs 208 mL).

Devido a escassez de trabalhos na literatura envolvendo a concentração espermática dessa primeira fração, torna-se difícil maiores comparações com a literatura consultada.

Pode-se observar na tabela 13, que os volumes de sêmen e diluidor necessários para a preparação de uma dose inseminante de 100 mL, contendo  $3 \times 10^9$  de espermatozóides móveis diferiram ( $P < 0,05$ ) entre as frações. Assim, para a fração 1, necessitou-se de um volume médio de apenas 2,76 mL de sêmen para a preparação de cada dose inseminante, enquanto que para a fração 2, esse volume foi de 18,22 mL de sêmen. Conseqüentemente, o volume médio de diluidor necessário para produzir uma dose inseminante de 100 mL, de cada fração, foi de 97,24 mL e 81,78 mL para as frações 1 e 2, respectivamente, podendo-se concluir que a taxa de diluição para a fração 1 foi de aproximadamente 1:35 (sêmen:diluidor), enquanto para a fração 2 variou entre 1:4 e 1:5 (sêmen:diluidor).

De acordo com Johnson et al. (2000), normalmente, a taxa de diluição do sêmen não ultrapassa uma relação de 1:10. Assim, considera-se ótima uma taxa de diluição (sêmen:diluidor) de 1:10 (Martin Rillo et al., 1994) ou entre 1:5 e 1:15 (Ruvalcaba, 1994), dependendo da concentração espermática do ejaculado. Segundo Levis (1997), a taxa de diluição ótima depende também das características físicas do diluidor utilizado, tais como pH, pressão osmótica e capacidade tamponante. Quando diluidores de longa duração, como o MR-A, são utilizados, a taxa ideal de diluição é de 1:8 a 1:15 (Ruvalcaba, 1994). Desta forma, considerando-se que nesse experimento utilizou-se também o diluidor MR-A, a taxa de diluição para a fração 2 ficou abaixo da recomendada por Ruvalcaba (1994) para esse diluidor. Segundo Flowers (1996) as doses inseminantes que têm pequena taxa de diluição, ou seja, menor que 1:5, apresentam baixa viabilidade espermática devido à carência de substratos energéticos e à perda da capacidade tamponante do meio, sendo observado por Alexpoulos et al. (1996) um decréscimo significativo da

motilidade espermática em doses inseminantes com menor diluição, quando comparadas às apresentando maiores taxas de diluição.

Entretanto, considerando-se a taxa de diluição de 1:35 utilizada para a fração 1, observa-se estarem os valores muito acima das recomendadas pela literatura, havendo relatos de uma redução da qualidade espermática quando os espermatozóides são submetidos à altas taxas de diluição. Razões para a redução da fertilidade e da viabilidade espermáticas em doses inseminantes apresentando altas taxas de diluição ( $> 1:15$ ) não são totalmente compreendidas, embora possa estar envolvido um fenômeno denominado choque osmótico (Flowers, 1996; Levis, 1997).

Dentro desse contexto merece ênfase, um trabalho utilizando sêmen equino (Varner et al., 1987) quando observou-se ser mais importante dar ênfase ao número de células espermáticas por mL de sêmen diluído, em detrimento da taxa de diluição, sendo que esse valor deveria estar no intervalo de 30 a  $50 \times 10^6$  de espermatozóides por mL de sêmen diluído. Dentro dessa premissa, observa-se que tanto as doses oriundas da fração 1 quanto as da fração 2 atendem à proposta de Varner et al. (1987).

Observa-se na tabela 13, que o tempo médio da colheita do sêmen à pré-diluição na fração 1 foi de 3,80 minutos. Considerando-se que não foi realizado a pré-diluição na fração 2, esse dado não está presente na tabela. O tempo da colheita do sêmen à diluição foi similar ( $p > 0,05$ ) entre as duas frações do ejaculado. Entretanto, o tempo da colheita do sêmen ao início do resfriamento, diferiu ( $p < 0,05$ ) entre as frações, sendo superior na fração 1. Isso pode ser explicado pelos diferentes horários registrados, da chegada das frações ao laboratório. Dessa forma, após a rápida

coleta da fração 1e seu envio ao mesmo, necessitava-se de um tempo adicional para a coleta da fração 2. Diante disto, como as doses eram resfriadas concomitantemente, ao longo de todo experimento, sempre houve uma diferença no intervalo de tempo

da colheita ao resfriamento entre as frações do ejaculado.

Na tabela 14 estão apresentados os dados referentes à cor e aspecto do sêmen observado entre as duas frações coletadas.

Tabela 14. Influência da fração do ejaculado sobre a cor/aspecto do sêmen *in natura* no Experimento I

Fração do ejaculado	Cor/aspecto do sêmen		
	Leitoso (%)	Soroso-leitoso(%)	Soroso (%)
1	100,0 (10/10)	0,00	0,00
2	50,0 (5/10)	50,0 (5/10)	0,00

Nota-se que em decorrência da grande concentração espermática presente na fração 1 do ejaculado, todas as coletas (100,00%) apresentaram aspecto leitoso. Entretanto, observa-se que na metade das frações 2 (50,00%), o grande volume de plasma seminal da fração pós-espermática e a menor concentração espermática encontrada nessa fração, fez com que o sêmen apresentasse aspecto soroso-leitoso. Em nenhuma das coletas, observou-se o

aspecto soroso para qualquer uma das frações.

Com relação ao número de aglutinações observado nas duas frações, em todas as coletas, a fração 1 apresentou somente de 1 a 2 aglutinações. De forma similar, na grande maioria das vezes (90,0%), a fração 2 também apresentou somente de 1 a 2 aglutinações no sêmen (tabela 15).

Tabela 15. Número de aglutinações no sêmen *in natura* de acordo com a fração do ejaculado, no Experimento I

Fração do ejaculado	Número de aglutinações		
	1 a 2	3 a 5	≥ 6
1	100,0 (10/10)	0,00	0,00
2	90,0 (9/10)	10,0 (1/10)	0,00

Finalmente, um importante aspecto a ser considerado na tabela 13, refere-se ao número potencial de fêmeas a serem inseminadas por cada fração do ejaculado, de  $6,36 \pm 0,75$  e  $12,45 \pm 1,26$  para as frações 1 e 2, respectivamente.

resultados do presente experimento, considerando-se as doses produzidas pelas duas frações (18,81 doses), aproxima-se dos apresentados, anteriormente, por Braga (2007), embora trabalhassem com doses inseminantes oriundas do ejaculado total.

Recentemente, Braga (2007) trabalhou com varrões das raças Landrace e Large White, pertencentes à mesma empresa (DanBred do Brasil), e observaram um número potencial de fêmeas a serem inseminadas por ejaculado de  $18,26 \pm 6,21$  e  $20,49 \pm 7,05$ , respectivamente, sendo o número médio, envolvendo as duas raças de  $19,14 \pm 6,57$  doses produzidas/ejaculado. Assim, os

Vale salientar o baixo volume utilizado para produzir 6 doses inseminantes, na fração 1. Comparando-se os volumes inseminantes utilizados na indústria da inseminação artificial envolvendo os bovinos, eqüinos, caprinos, ovinos e outros, verifica-se o quão difícil é estabelecer protocolos que envolvem o resfriamento e transporte ou o congelamento do sêmen de varrões. Saravia

et al. (2010) propôs a utilização deste importante conhecimento da coleta fracionada do sêmen, visando a simplificação dos procedimentos relacionados à criopreservação, eliminando-se um item importante do processo, capaz de concentrar sobremaneira o ejaculado do suíno, que é a centrifugação. É nossa proposta, ao final destes experimentos, propor um novo protocolo de coleta, diluição, resfriamento e transporte do sêmen, envolvendo duas diluições a intervalos que estão sendo determinados.

#### 4.1.2 Características físicas do sêmen diluído e resfriado a 5 ou 17°C por 0, 12, 24, 36, 48 e 72 horas de armazenamento, em contêiner especial

Os valores médios de motilidade e vigor espermáticos do sêmen, para os quatro tratamentos, nos diferentes períodos de avaliação, estão apresentados na tabela 17. De acordo com o modelo proposto (tabela 16) observa-se que as características físicas do sêmen diluído e resfriado foram influenciadas ( $p < 0,05$ ) pelo diluidor, pela fração, pelo tempo, e pelas interações diluidor x tempo e fração x tempo.

Tabela 16. Efeito do diluidor, fração, tempo e suas interações sobre as características físicas do sêmen diluído e resfriado

Fonte de Variação	Nível de probabilidade
Diluidor	0,0001
Fração	0,0001
Tempo	0,0001
Diluidor x Fração	0,1000
Diluidor x Tempo	0,0001
Fração x Tempo	0,0001
Diluidor x Fração x Tempo	0,9991

Observa-se na tabela 17, que logo após a diluição e preparação das doses de sêmen (tempo 0), o valor para motilidade diferiu ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos. Assim, a motilidade espermática observada para o tratamento F2T2 (fração 2 do ejaculado, diluída no diluidor glicina-gema de ovo e resfriada a 5°C), diferiu da observada no tratamento F1T1 (fração 1 do ejaculado, diluída no diluidor MR-A e resfriada a 17°C). No tempo de 12 horas após o resfriamento, observou-se, em todos os tratamentos, uma manutenção da motilidade espermática. Nota-se, que com exceção do tratamento F2T2, que manteve uma motilidade similar ( $p > 0,05$ ) por um período de 72 horas após o resfriamento, sendo inclusive superior aos demais neste período, todos os outros tratamentos apresentaram uma redução da motilidade em decorrência

do tempo, notadamente após às 24 horas de armazenamento. Contudo, comparando-se os tratamentos entre si, ao longo do tempo de estocagem, excetuando-se o tratamento F2T2, que como mencionado, foi superior aos demais tratamentos, o grupo F1T1 apresentou a maior redução da motilidade que foi inferior ( $p < 0,05$ ) às demais (F1T2 e F2T1), já a partir de 24 horas de armazenamento, sendo que as diferenças persistiram até às 72 horas de estocagem, quando do término do experimento. Os grupos F1T2 e F2T1 mantiveram uma motilidade similar por até 36 horas de estocagem. A partir das 48 horas, o tratamento F1T2, oriundo da fração 1 do ejaculado apresentou motilidade inferior à do grupo F2T1, nos dois tempos que se seguiram (48 e 72 horas).

Tabela 17. Características físicas do sêmen diluído e resfriado à 5 ou 17°C por 0, 12, 24, 36, 48 e 72 horas de armazenamento, em contêiner especial

Tempo de armazenamento (horas)	Tratamentos			
	F1T1	F1T2	F2T1	F2T2
	Motilidade espermática (%)			
0	59,00 ± 2,61 <sup>Ab</sup>	64,50 ± 2,61 <sup>Aab</sup>	65,50 ± 2,61 <sup>ABab</sup>	70,00 ± 2,61 <sup>Aa</sup>
12	60,50 ± 2,61 <sup>Ab</sup>	66,50 ± 2,61 <sup>Ab</sup>	68,00 ± 2,61 <sup>Aab</sup>	74,50 ± 2,61 <sup>Aa</sup>
24	54,50 ± 2,61 <sup>Ac</sup>	64,50 ± 2,61 <sup>Ab</sup>	66,00 ± 2,61 <sup>ABb</sup>	74,50 ± 2,61 <sup>Aa</sup>
36	40,50 ± 2,61 <sup>Bc</sup>	55,00 ± 2,61 <sup>Bb</sup>	58,50 ± 2,61 <sup>BCb</sup>	73,00 ± 2,61 <sup>Aa</sup>
48	25,50 ± 2,61 <sup>Cd</sup>	43,50 ± 2,61 <sup>Cc</sup>	53,50 ± 2,61 <sup>Cb</sup>	72,00 ± 2,61 <sup>Aa</sup>
72	14,50 ± 2,61 <sup>Dd</sup>	30,50 ± 2,61 <sup>Dc</sup>	45,00 ± 2,61 <sup>Db</sup>	68,00 ± 2,61 <sup>Aa</sup>
	Vigor espermático (0 – 5)			
0	3,35 ± 0,15 <sup>Ac</sup>	3,75 ± 0,15 <sup>Aab</sup>	3,60 ± 0,15 <sup>ABbc</sup>	4,05 ± 0,15 <sup>Aba</sup>
12	3,25 ± 0,15 <sup>Ac</sup>	3,55 ± 0,15 <sup>ABbc</sup>	3,75 ± 0,15 <sup>Ab</sup>	4,10 ± 0,15 <sup>Aa</sup>
24	3,00 ± 0,15 <sup>ABb</sup>	3,55 ± 0,15 <sup>ABb</sup>	3,50 ± 0,15 <sup>ABCb</sup>	4,10 ± 0,15 <sup>Aa</sup>
36	2,60 ± 0,15 <sup>Bc</sup>	3,10 ± 0,15 <sup>BCb</sup>	3,25 ± 0,15 <sup>BCb</sup>	4,00 ± 0,15 <sup>Aba</sup>
48	2,10 ± 0,15 <sup>Cc</sup>	2,80 ± 0,15 <sup>CDB</sup>	3,00 ± 0,15 <sup>CDB</sup>	3,80 ± 0,15 <sup>BCa</sup>
72	1,45 ± 0,15 <sup>Cc</sup>	2,50 ± 0,15 <sup>Db</sup>	2,70 ± 0,15 <sup>Db</sup>	3,50 ± 0,15 <sup>Ca</sup>

<sup>a,b,c,d</sup> Médias seguidas por letras diferentes, na mesma linha, dentro da mesma variável, diferem (p<0,05)

<sup>A,B,C,D</sup> Médias seguidas por letras diferentes, na mesma coluna, dentro da mesma variável, diferem (p<0,05)

F1T1- Fração 1 do ejaculado, diluída no diluidor MR-A e resfriada à 17°C;

F1T2- Fração 1 do ejaculado, diluída no diluidor glicina-gema de ovo e resfriada à 5°C;

F2T1- Fração 2 do ejaculado, diluída no diluidor MR-A e resfriada à 17°C;

F2T2- Fração 2 do ejaculado, diluída no diluidor glicina-gema de ovo e resfriada à 5°C;

As análises estatísticas correspondentes aos dados da tabela 17 encontra-se no anexo Ib, do experimento I (páginas 167 a 174).

De uma maneira geral, todos os tratamentos mantiveram uma motilidade aceitável, superior à 50%, nas primeiras 24 horas de armazenamento, independentemente da fração do ejaculado (Fração 1 ou 2) e do protocolo de resfriamento empregado, incluindo dois diluidores de sêmen (MR-A ou glicina gema de ovo) e duas temperaturas de estocagem (17°C ou 5°C), respectivamente (tabela 17).

A partir de 36 horas de armazenamento, especialmente às 48 e 72 horas, ocorreu um descolamento com redução acentuada (p<0,05) da motilidade nos tratamentos oriundos da Fração 1 (F1T1 e F1T2), em relação aos da Fração 2 (F2T1 e F2T2).

Diante dos resultados apresentados anteriormente, parece haver, no que diz respeito à manutenção da motilidade

espermática, uma participação muito mais efetiva da fração do ejaculado, do que do protocolo de resfriamento do sêmen empregado. Entretanto, a superioridade (p<0,05) do tratamento F2T2 em relação aos outros, a partir de 24 horas de estocagem, pode refletir um efeito aditivo da fração do ejaculado e do protocolo de resfriamento, incluindo a macromolécula gema de ovo e uma temperatura de estocagem à 5°C, capaz de reduzir o metabolismo espermático e a multiplicação bacteriana. Como resultante, observa-se, neste tratamento, o aumento da longevidade espermática.

Com relação aos valores médios do vigor espermático observados entre os tratamentos, o grupo F2T2 novamente apresentou os melhores resultados, similarmente ao que já havia sido observado para a variável motilidade espermática. Observa-se que nesse grupo, o vigor espermático manteve-se similar (p>0,05) por até 36 horas de resfriamento,

quando houve uma redução progressiva dos seus valores nos tempos de 48 e 72 horas de estocagem. Mesmo assim, os valores encontrados nesses dois últimos tempos foram sempre superiores ( $p < 0,05$ ) aos observados nos demais tratamentos. Segundo Silveira e Iais (1999), somente o sêmen apresentando um vigor mínimo de três é capaz de manter sua capacidade fecundante. Nesse sentido, observa-se que em todos os tratamentos, esse valor foi mantido por até 24 horas de estocagem. Contudo, vale ressaltar, que o grupo F1T1 apresentou os menores valores de vigor espermático, assim como se observou para a variável motilidade espermática. Observa-se, neste tratamento, uma queda acentuada dos valores de vigor espermático a partir de 36 horas de estocagem, quando diferiu ( $p < 0,05$ ) dos outros tratamentos (F1T2, F2T1, F2T2) em todos os períodos subsequentes de estocagem avaliados (36, 48 e 72 horas).

O vigor espermático apresentou o mesmo comportamento nos tratamentos F1T2 e F2T1, quando se observou uma queda progressiva dos seus valores, ao longo do período de armazenagem do sêmen, independentemente da fração do ejaculado e do protocolo de resfriamento utilizado. Apesar disto, para todos os períodos avaliados, de 0 a 72 horas, os valores de vigor espermático não diferiram ( $p > 0,05$ ), entre os dois tratamentos.

Também, aqui, vale registrar, a superioridade ( $p < 0,05$ ) do tratamento F2T2, no que se refere à manutenção do vigor espermático, quando comparado aos dos outros tratamentos (F1T1, F1T2 e F2T1), já a partir de 12 horas de estocagem. Pode ser que esta observação reflita um efeito aditivo da fração do ejaculado e do protocolo de resfriamento do sêmen, mencionados anteriormente no que se refere a manutenção da motilidade espermática.

De Ambrogi et al. (2006) observaram que a percentagem de motilidade das células espermáticas reduziu com o tempo de armazenamento do sêmen, demonstrando que o seu armazenamento à 17°C, por 96 horas, pode afetar a sua capacidade fecundante. Miller (2007) comparou a motilidade espermática às 2 e 24 horas a partir da diluição e resfriamento do sêmen, sendo que as doses diluídas em 20 mL de diluidor, continham 500, 1000, 1500 ou 2000 x 10<sup>6</sup> de espermatozoides/dose inseminante. A autora cita que apenas a concentração de 500 x 10<sup>6</sup> de espermatozoides por dose inseminante apresentou menor valor ( $p < 0,05$ ) de motilidade (56,9% e 39,9% nos tempos de 2 e 24 horas, respectivamente) em relação às demais doses, que não diferiram entre si. Demonstrou-se, ainda, que para todas as concentrações, observou-se redução ( $p < 0,05$ ) da motilidade espermática, após o armazenamento do sêmen à temperatura de 16-19°C, por 24 horas. A motilidade média, independentemente da concentração espermática/dose inseminante, quando de 24 horas de estocagem, foi de 57,3%, um pouco inferior à encontrada no presente experimento, que variou de 54,50% a 74,50% (tabela 17).

Costi (2003) realizou um experimento visando comparar a motilidade espermática do sêmen diluído em três diluidores (BTS, Androhep®Enduraguard™ e Androhep®), contendo as doses inseminantes 3 x 10<sup>9</sup> de espermatozoides em 100 mL e armazenadas por até 144 horas à 17°C. Os percentuais de motilidade foram superiores ( $P < 0,05$ ), das 48 até 144 h de armazenamento, para o sêmen diluído em Androhep® Enduraguard™ e Androhep®, em comparação ao BTS. No último dia de armazenamento (144h), o valor da motilidade do sêmen diluído em Androhep® foi superior ( $P < 0,05$ ) à do sêmen diluído em Androhep® Enduraguard™.

Os valores de motilidade apresentados pelos autores foram superiores aos encontrados no presente experimento. Assim, após 24 horas de resfriamento, a motilidade média encontrada foi de 76,46%, 85,63% e 90,00% para os diluidores BTS, Androhep®Enduraguard™ e Androhep®, respectivamente. Às 72 horas de estocagem, tempo máximo utilizado no presente experimento, o autor apresentou valores de 61,67%, 85,83% e 88,42% para os três diluidores citados, na mesma ordem anterior, sendo estes resultados, numericamente, muito superiores aos encontrados aqui. Segundo o autor, os valores de motilidade observados para o sêmen diluído em Androhep® e Androhep® Enduraguard™, armazenado a 17°C, se situam dentro das variações observadas nos demais trabalhos realizados na área, sendo que a motilidade do sêmen diluído em BTS esteve abaixo dos valores relatados por outros autores.

A metodologia utilizada para avaliação da motilidade espermática por Costi (2003) foi semelhante a utilizada no presente experimento, sendo realizada de maneira subjetiva em ambos os trabalhos. Embora seja difícil comparar os dados de ambos experimentos, pode-se atribuir as diferenças na motilidade observada entre os trabalhos à forma de julgamento e classificação subjetiva, já que considera-se que essa avaliação pode apresentar diferenças entre avaliadores. Contudo, não se pode descartar outros fatores relacionados ao processamento do sêmen capazes de influenciar o percentual de motilidade espermática em uma amostra.

#### **4.1.3 Características morfológicas do sêmen diluído, resfriado a 5 ou 17°C e armazenado por 0, 12, 24, 36, 48 e 72 horas em contêiner especial**

Os dados referentes às percentagens de espermatozoides normais ou com alterações morfológicas para os quatro tratamentos utilizados no experimento I, nos diferentes tempos de armazenamento estão apresentados a seguir (tabelas 18 a 25). Observa-se, nestas tabelas, que os dados estão apresentados considerando-se, isoladamente, as células normais e as apresentando defeitos de cabeça, peça intermediária, cauda, acrossoma, presença de gota citoplasmática proximal e distal, além do total de defeitos observados nos quatro tratamentos, ao longo dos diferentes tempos de estocagem do sêmen.

As percentagens médias de células normais nos diferentes períodos de tempo, considerando-se os quatro tratamentos (tabela 18) foram de aproximadamente 80%, como recomendado por Shipley (1999) e Johnson et al. (2000). Além disso, a fração do ejaculado não influenciou ( $p>0,05$ ) a percentagem de células normais no sêmen fresco. Entretanto, logo após a diluição (0 horas) o sêmen diluído no diluidor glicina-gema de ovo apresentou maiores valores no que se refere a normalidade espermática, em relação ao diluído no diluidor MR-A. Observa-se, ainda, que nos períodos de 12 e 24 horas houve uma superioridade da fração 1, diluída no diluidor glicina-gema de ovo em relação as frações 1 e 2 diluídas em MR-A.

Entretanto, a partir das 36 horas de resfriamento, não observou-se efeito do método de conservação ( $p > 0,05$ ) sobre o percentual de células normais. No que diz respeito ao comportamento das células espermáticas, dentro de cada tratamento, nos diferentes períodos de estocagem do sêmen, observa-se uma redução

significativa ( $p < 0,05$ ) das percentagens de células normais em todos os tratamentos, a partir dos valores do sêmen à fresco. Contudo, no tratamento utilizando a fração 1 diluída em diluidor MR-A (F1T1), os valores foram similares, do momento da diluição (0 horas) até o final do período de estocagem (72 horas).

Tabela 18. Percentagens de espermatozoides morfolologicamente normais nos diferentes tratamentos e tempos de estocagem do sêmen

Tempo	Fração do ejaculado			
	Fração 1		Fração 2	
	MR-A(F1T1)	Glicina-gema(F1T2)	MR-A(F2T1)	Glicina-gema(F2T2)
<b>Sêmen fresco</b>	88,60 ± 1,39 <sup>A</sup>	88,60 ± 1,39 <sup>A</sup>	87,00 ± 0,98 <sup>A</sup>	87,00 ± 0,98 <sup>AB</sup>
<b>0 horas</b>	81,20 ± 1,33 <sup>Bb</sup>	89,40 ± 1,33 <sup>Aa</sup>	82,30 ± 1,33 <sup>ABb</sup>	90,00 ± 1,33 <sup>Aa</sup>
<b>12 horas</b>	81,50 ± 1,33 <sup>Bb</sup>	87,90 ± 1,33 <sup>ABa</sup>	82,20 ± 1,53 <sup>ABb</sup>	86,30 ± 1,53 <sup>ABCab</sup>
<b>24 horas</b>	81,00 ± 1,38 <sup>Bb</sup>	86,30 ± 1,38 <sup>ABCa</sup>	80,40 ± 1,38 <sup>ABb</sup>	82,80 ± 1,38 <sup>BCab</sup>
<b>36 horas</b>	80,10 ± 1,55 <sup>B</sup>	84,00 ± 1,55 <sup>BCD</sup>	80,80 ± 1,55 <sup>AB</sup>	81,60 ± 1,55 <sup>BC</sup>
<b>48 horas</b>	79,20 ± 1,62 <sup>B</sup>	83,30 ± 1,62 <sup>CD</sup>	78,30 ± 1,62 <sup>B</sup>	81,60 ± 1,62 <sup>BC</sup>
<b>72 horas</b>	78,30 ± 2,00 <sup>B</sup>	81,00 ± 2,00 <sup>D</sup>	77,10 ± 2,00 <sup>B</sup>	81,00 ± 2,00 <sup>C</sup>

<sup>a,b</sup> Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha, diferem ( $p < 0,05$ )

<sup>A,B,C,D</sup> Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna, diferem ( $p < 0,05$ )

As análises estatísticas referentes à tabela 18, estão apresentadas no anexo Ic do Experimento I (página 174 a 176).

Na tabela 19 estão apresentadas as percentagens de espermatozoides com defeito de cabeça para os quatro tratamentos, considerando-se os diferentes tempos de estocagem do sêmen. Apenas no sêmen pós-diluído (0 horas) observou-se diferenças ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos. Assim, células espermáticas oriundas da fração 2 e diluídas no diluidor glicina-gema de ovo apresentaram um maior percentual de defeitos de cabeça que as oriundas da fração 1, diluídas em MR-A, não havendo uma explicação lógica para essas diferenças. Comparando-se os valores

observados nos diferentes tempos de estocagem do sêmen, dentro do mesmo tratamento, verifica-se um aumento gradativo ( $p < 0,05$ ) da patologia de cabeça no decorrer do armazenamento, apenas na fração 1 diluída no diluidor MR-A (F1T1).

Vale ressaltar, que os percentuais médios de defeitos de cabeça, para todos os tratamentos, nos diferentes tempos de estocagem, foram sempre inferiores a 5%, sendo este o valor máximo aceitável em uma amostra, para que não ocorra prejuízos à fertilidade (CBRA, 1998). Martinez et al. (1986) citam valores de 1,5 a 1,7 como percentagens habituais encontradas na espécie suína para as alterações de cabeça.

Tabela 19. Percentagens de espermatozoides com defeitos de cabeça nos diferentes tratamentos e tempos de estocagem do sêmen

Tempo	Fração do ejaculado			
	Fração 1		Fração 2	
	MR-A(F1T1)	Glicina-gema(F1T2)	MR-A(F2T1)	Glicina-gema(F2T2)
<b>Sêmen fresco</b>	0,90 ± 0,18 <sup>C</sup>	0,90 ± 0,18	2,00 ± 0,47	2,00 ± 0,47
<b>0 horas</b>	1,20 ± 0,30 <sup>BCb</sup>	2,20 ± 0,30 <sup>ab</sup>	1,90 ± 0,30 <sup>ab</sup>	2,60 ± 0,30 <sup>a</sup>
<b>12 horas</b>	2,60 ± 0,50 <sup>ABC</sup>	2,10 ± 0,50	1,70 ± 0,50	2,00 ± 0,50
<b>24 horas</b>	2,50 ± 0,55 <sup>ABC</sup>	2,00 ± 0,55	2,30 ± 0,55	1,80 ± 0,55
<b>36 horas</b>	2,60 ± 0,52 <sup>AB</sup>	2,10 ± 0,52	3,30 ± 0,52	2,10 ± 0,52
<b>48 horas</b>	2,80 ± 0,51 <sup>AB</sup>	2,30 ± 0,51	2,70 ± 0,51	2,20 ± 0,51
<b>72 horas</b>	3,40 ± 0,63 <sup>A</sup>	2,30 ± 0,63	2,90 ± 0,63	2,60 ± 0,63

<sup>a,b</sup> Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha, diferem ( $p < 0,05$ )

<sup>A,B,C</sup> Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna, diferem ( $p < 0,05$ )

As análises estatísticas referentes à tabela 19, estão apresentadas no anexo Id do Experimento I (página 176 a 179).

As percentagens médias de defeitos da peça intermediária, nos diferentes tratamentos e tempos de estocagem do sêmen, estão apresentadas na tabela 20. Não houve efeito ( $p > 0,05$ ) do método de conservação do sêmen em nenhum dos momentos avaliados para esta patologia espermática.

No presente experimento, os percentuais de células espermáticas apresentando lesões de peça intermediária foram inferiores a 5% (tabela 20), valor máximo aceitável em uma amostra de sêmen para esta variável de acordo com CBRA (1998).

Segundo Settergren e Nicander (1972) em varrões com problemas de fertilidade, os percentuais de lesões da peça intermediária variam de 38 a 75%.

Tabela 20. Percentuais de espermatozoides com defeito de peça intermediária nos diferentes tratamentos e tempos de estocagem do sêmen

Tempo	Fração do ejaculado			
	Fração 1		Fração 2	
	MR-A(F1T1)	Glicina-gema(F1T2)	MR-A(F2T1)	Glicina-gema(F2T2)
<b>Sêmen fresco</b>	1,90 ± 0,46	1,90 ± 0,46	2,00 ± 0,42	2,00 ± 0,42
<b>0 horas</b>	2,50 ± 0,56	2,00 ± 0,56	2,20 ± 0,56	1,90 ± 0,56
<b>12 horas</b>	2,60 ± 0,58	3,10 ± 0,58	2,30 ± 0,58	2,00 ± 0,58
<b>24 horas</b>	2,60 ± 0,61	3,50 ± 0,61	1,90 ± 0,61	2,80 ± 0,61
<b>36 horas</b>	4,00 ± 0,84	3,30 ± 0,84	1,90 ± 0,84	2,90 ± 0,84
<b>48 horas</b>	4,50 ± 0,81	3,10 ± 0,81	3,00 ± 0,81	3,80 ± 0,81
<b>72 horas</b>	3,60 ± 0,79	3,10 ± 0,79	3,40 ± 0,79	3,30 ± 0,79

As análises estatísticas referentes à tabela 20, estão apresentadas no anexo Ie do Experimento I (página 179 a 182).

Na tabela 21 estão apresentados os valores médios de defeitos de cauda encontrados nos diferentes tratamentos e tempos de estocagem do sêmen. No sêmen fresco, não observou-se diferenças entre os tratamentos

( $p > 0,05$ ) quanto aos defeitos de cauda. Após a diluição (0 horas) observou-se diferenças ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos, sendo que as células espermáticas diluídas no diluidor MR-A, independentemente da fração do ejaculado a qual pertenciam, apresentaram maiores percentuais de defeitos de cauda que as diluídas no diluidor glicina-gema de ovo. Com exceção

das 36 horas, observou-se diferenças ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos nos diferentes tempos de estocagem avaliados (12, 24, 48 e 72 horas). De uma maneira geral, o método de conservação incluindo o diluidor de glicina-gema de ovo e a manutenção a 5°C (F1T2 e F2T2), conferiu melhor proteção às células espermáticas. Entretanto, não observou-se influência ( $p > 0,05$ ) do tempo de estocagem sobre o percentual de células espermáticas apresentando defeitos de cauda.

Visando estudar a influência da morfologia espermática sobre o potencial fecundante de um ejaculado, Gadea (1997) classificou 60 ejaculados em três grupos, de acordo com as taxas de concepção resultantes da inseminação artificial de 300 fêmeas: grupo I - ejaculados que resultaram em fertilidade inferior a 20%; grupo II - ejaculados associados a uma fertilidade entre 40 e 60%; grupo III - ejaculados que resultaram em uma fertilidade superior a 80%. Quando da avaliação das morfoanomalias espermáticas, de forma individualizada, observou-se que os ejaculados do grupo I

apresentaram os maiores valores de cauda dobrada, que diferiram ( $p < 0,01$ ) dos ejaculados dos grupos II e III, que por sua vez não diferiram entre si. Os percentuais de cauda dobrada foram de  $15,22 \pm 2,14$  para os ejaculados do grupo I, e de  $7,17 \pm 1,46$  e  $4,04 \pm 1,00$ , respectivamente, para os ejaculados dos grupos II e III.

Recomenda-se, de acordo com CBRA (1998), percentuais inferiores a 10% para os defeitos de cauda. Este limite está de acordo com o observado por Martinez et al. (1986), que apresentaram valores de 4,7 a 10,5% como habituais para esta patologia espermática na espécie suína. Em um trabalho conduzido por Valenzuela (1982), observou-se que a patologia mais frequentemente encontrada em machos Landrace e Yorkshire foi a cauda dobrada com gota citoplasmática distal anexa, com média geral de  $7,4 \pm 14,2\%$ . Embora os valores observados no presente experimento tenham ultrapassado os 10% em algumas situações, estiveram, na maioria das vezes, dentro dos percentuais recomendados pela literatura.

Tabela 21. Percentuais de espermatozoides com defeito de cauda nos diferentes tratamentos e tempos de estocagem do sêmen

Tempo	Fração do ejaculado			
	Fração 1		Fração 2	
	MR-A(F1T1)	Glicina-gema(F1T2)	MR-A(F2T1)	Glicina-gema(F2T2)
<b>Sêmen fresco</b>	$4,30 \pm 1,29^B$	$4,30 \pm 1,29$	$7,40 \pm 1,09$	$7,40 \pm 1,09$
<b>0 horas</b>	$10,10 \pm 0,93^{Aa}$	$2,60 \pm 0,93^b$	$11,70 \pm 0,93^a$	$3,50 \pm 0,93^b$
<b>12 horas</b>	$8,60 \pm 1,66^{Aab}$	$4,10 \pm 1,66^b$	$11,40 \pm 1,66^a$	$6,20 \pm 1,66^{ab}$
<b>24 horas</b>	$9,00 \pm 1,62^{Aa}$	$3,90 \pm 1,62^b$	$13,10 \pm 1,62^a$	$8,90 \pm 1,62^a$
<b>36 horas</b>	$7,80 \pm 1,54^A$	$6,10 \pm 1,54$	$11,40 \pm 1,54$	$7,40 \pm 1,54$
<b>48 horas</b>	$9,10 \pm 1,83^{Aab}$	$6,30 \pm 1,83^b$	$13,60 \pm 1,83^a$	$6,70 \pm 1,83^b$
<b>72 horas</b>	$9,60 \pm 1,82^{Aab}$	$7,20 \pm 1,82^{ab}$	$13,30 \pm 1,82^a$	$5,40 \pm 1,82^b$

<sup>a,b</sup> Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha, diferem ( $p < 0,05$ )

<sup>A,B</sup> Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna, diferem ( $p < 0,05$ )

As análises estatísticas referentes à tabela 21, estão apresentadas no anexo If do Experimento I (página 182 a 184).

As percentagens médias de defeitos acrossomais encontradas nos diferentes tratamentos e tempos de estocagem do sêmen, no presente experimento, estão

apresentadas na tabela 22. Não observou-se diferenças para esta variável entre os tratamentos, no sêmen a fresco. Observa-se, entretanto, que de maneira geral as células espermáticas diluídas no diluidor glicina-gema de ovo e armazenadas a 5°C, apresentaram as maiores percentagens de defeitos acrossomais, independentemente da fração do ejaculado a qual pertenciam, quando comparadas às diluídas em MR-A e mantidas a 17°C, notadamente após as 24 horas de estocagem. Possivelmente, esta diferença se deva à menor temperatura de estocagem associada ao diluidor glicina-gema de ovo (5°C) em relação a temperatura associada ao diluidor MR-A (17°C) e que impõem grande desafio as membranas das células espermáticas, especialmente às dos varrões. Quanto aos percentuais de lesões acrossomais observados nos diferentes tempos de estocagem do sêmen, dentro do mesmo tratamento, verifica-se que os valores aumentaram progressivamente ( $p < 0,05$ ) no decorrer da estocagem do sêmen, com exceção do tratamento FIT1, quando os valores não diferiram ( $p > 0,05$ ) entre si, desde a coleta até as 72 horas de armazenamento.

Embora as avaliações de acrossoma sejam mais trabalhosas e requeiram maior habilidade e treinamento do técnico, alguns pesquisadores sugerem que a sua integridade deve ser melhor indicador da qualidade espermática que a motilidade (Rozeboom, 2000). O acrossoma armazena enzimas fundamentais no processo de penetração do oócito (Mann e Lutwak-Mann, 1981), de maneira que a presença de anormalidades morfológicas nesta região está associada a uma redução da fertilidade (Hashizume et al., 1990).

Como valores de referência, Martinez et al. (1993) consideraram como ideal o intervalo entre 85 a 94% de acrossomas normais, enquanto Waberski et al. (1994c) descrevem o intervalo entre 76 a 93,3%.

As alterações morfológicas do acrossoma são devidas a processos fisiológicos, podendo ser associadas ao envelhecimento da célula espermática ou ao processo de fecundação (Yanagimachi, 1994). Entretanto, lesões no acrossoma podem ser desencadeadas como consequência do choque pelo frio, nos processos de congelamento/descongelamento do espermatozóide, como resultados de mudanças na pressão osmótica, diluições e por lavagens e centrifugações repetidas (Mann e Lutwak-Mann, 1981).

As percentagens de defeitos acrossomais não devem ultrapassar os 5% em uma amostra de sêmen a ser utilizada para a inseminação artificial (CBRA, 1998). No presente experimento, o valor máximo observado para esta patologia espermática aproxima-se do recomendado pela literatura. Ivanova e Mollova (1993) citam um percentual de  $94,24 \pm 0,3$  de acrossomas normais, como o ideal para a espécie suína. Já Martin-Rillo et al. (1996) recomendam como ideal um valor acima de 70% de acrossomas normais em ejaculados a serem utilizados para a inseminação artificial, enquanto Galli e Bosisio (1988) recomendam um valor de  $87,7 \pm 1,14$  de acrossomas normais.

Valenzuela (1982) encontrou um valor médio para esta patologia de  $4,1 \pm 16,0\%$ . Segundo o mesmo autor, a média e o desvio padrão foram profundamente influenciados pelas alterações apresentadas por quatro machos em particular, os quais apresentaram médias de 29,5, 49,0, 70,0 e 91,08% de espermatozoides com transtornos do acrossoma, enquanto nos 57 machos restantes avaliados, a média foi de 0,80%.

De maneira geral, baseando-se na literatura disponível não se esperaria uma influência da morfologia acrossomica sobre a fertilidade nas condições utilizadas no presente experimento.

Tabela 22. Percentuais de espermatozoides com defeito de acrossoma nos diferentes tratamentos e tempos de estocagem do sêmen

Tempo	Fração do ejaculado			
	Fração 1		Fração 2	
	MR-A(F1T1)	Glicina-gema(F1T2)	MR-A(F2T1)	Glicina-gema(F2T2)
<b>Sêmen fresco</b>	0,10 ± 0,10	0,10 ± 0,10 <sup>D</sup>	0,10 ± 0,10 <sup>BC</sup>	0,10 ± 0,10 <sup>D</sup>
<b>0 horas</b>	0,10 ± 0,22 <sup>b</sup>	0,60 ± 0,22 <sup>CDab</sup>	0,00 ± 0,22 <sup>Cb</sup>	1,00 ± 0,22 <sup>CDa</sup>
<b>12 horas</b>	0,50 ± 0,42 <sup>b</sup>	1,50 ± 0,42 <sup>BCab</sup>	0,70 ± 0,42 <sup>ABCab</sup>	2,40 ± 0,42 <sup>BCa</sup>
<b>24 horas</b>	0,50 ± 0,43 <sup>b</sup>	2,80 ± 0,43 <sup>ABa</sup>	0,90 ± 0,43 <sup>ABCb</sup>	3,20 ± 0,43 <sup>ABa</sup>
<b>36 horas</b>	0,50 ± 0,45 <sup>b</sup>	2,90 ± 0,45 <sup>ABa</sup>	1,20 ± 0,45 <sup>Ab</sup>	4,40 ± 0,45 <sup>ABa</sup>
<b>48 horas</b>	0,70 ± 0,62 <sup>b</sup>	3,70 ± 0,62 <sup>Aa</sup>	1,30 ± 0,62 <sup>Ab</sup>	5,30 ± 0,62 <sup>ABa</sup>
<b>72 horas</b>	0,80 ± 0,71 <sup>b</sup>	5,00 ± 0,71 <sup>Aa</sup>	1,10 ± 0,71 <sup>ABb</sup>	6,50 ± 0,71 <sup>Aa</sup>

<sup>a,b</sup> Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha, diferem ( $p < 0,05$ )

<sup>A,B,C,D</sup> Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna, diferem ( $p < 0,05$ )

As análises estatísticas referentes à tabela 22, estão apresentadas no anexo Ig do Experimento I (página 185 a 187).

Nas tabelas 23 e 24 estão apresentados os percentuais de gotas proximais e distais, respectivamente, nos diferentes tratamentos e tempos de estocagem do sêmen. Com relação à presença de gota proximal, não observou-se influência ( $p > 0,05$ ) do método de conservação nem do tempo de estocagem do sêmen sobre esta patologia em particular. Como foram utilizados apenas varrões sexualmente maduros e de comprovada eficiência reprodutiva, tal observação encontra-se dentro do esperado, considerando-se que a presença de gota proximal é um forte indicativo de imaturidade sexual dos machos (Furtado et al., 2006) ou da presença de processos patológicos.

Em um experimento já mencionado anteriormente no item referente a patologia de cauda, Gadea (1997) classificou 60

ejaculados em tipo I (ejaculados que proporcionaram menos que 20% de fertilidade), tipo II (ejaculados que proporcionaram uma fertilidade entre 40 e 60%) e tipo III (aqueles que resultaram em uma fertilidade superior a 80%). Os ejaculados que resultaram em menor fertilidade (tipo I) diferiram ( $p < 0,01$ ) quanto aos defeitos de cauda daqueles dos tipos II e III. O mesmo se deu quanto as percentagens de gotas citoplasmáticas proximais, com valores de  $26,77 \pm 5,59$  para o tipo I e de  $14,17 \pm 3,36$  e  $6,15 \pm 1,22$  para os tipos II e III, respectivamente, quando demonstrou-se o efeito negativo dessa patologia sobre os resultados de fertilidade.

No que diz respeito aos valores de gota citoplasmática proximal considerados normais em um ejaculado suíno, Martinez et al. (1986) propõem uma amplitude de 2,2 a 9,4%, enquanto CBRA (1998) considera o valor de 10%, como o limite aceitável para essa patologia espermática.

Tabela 23. Percentuais de espermatozoides apresentando gota proximal nos diferentes tratamentos e tempos de estocagem do sêmen

Tempo	Fração do ejaculado			
	Fração 1		Fração 2	
	MR-A(F1T1)	Glicina-gema(F1T2)	MR-A(F2T1)	Glicina-gema(F2T2)
<b>Sêmen fresco</b>	0,60 ± 0,22	0,60 ± 0,22	0,40 ± 0,16	0,40 ± 0,16
<b>0 horas</b>	0,60 ± 0,16	0,20 ± 0,16	0,30 ± 0,16	0,20 ± 0,16
<b>12 horas</b>	0,20 ± 0,16	0,10 ± 0,16	0,60 ± 0,16	0,10 ± 0,16
<b>24 horas</b>	0,20 ± 0,14	0,30 ± 0,14	0,30 ± 0,14	0,20 ± 0,14
<b>36 horas</b>	0,30 ± 0,15	0,50 ± 0,15	0,20 ± 0,15	0,40 ± 0,15
<b>48 horas</b>	0,20 ± 0,09	0,20 ± 0,09	0,00 ± 0,09	0,00 ± 0,09
<b>72 horas</b>	0,10 ± 0,15	0,40 ± 0,15	0,20 ± 0,15	0,20 ± 0,15

As análises estatísticas referentes à tabela 23, estão apresentadas no anexo Ih do Experimento I (página 187 a 190).

Quanto aos percentuais de gotas distais observados nos diferentes tratamentos e tempos de estocagem do sêmen (tabela 24), verifica-se que no sêmen a fresco, a fração 1 do ejaculado apresentou valores superiores aos da fração 2, independentemente do método de conservação do sêmen. Este achado está de acordo com Furtado et al.(2006), que citam

que as frações iniciais do ejaculado apresentam um maior percentual de gotas distais quando comparadas ao restante do ejaculado. Apenas no tratamento F1T2 observou-se uma redução ( $p < 0,05$ ) do percentual de gotas distais ao longo do tempo de armazenamento, não sendo possível uma explicação lógica para esta observação. Nos demais tratamentos, observou-se a manutenção dos percentuais de gota distal ao longo do período de estocagem ( $p > 0,05$ ), dentro do mesmo tratamento.

Tabela 24. Percentuais de espermatozoides apresentando gota distal nos diferentes tratamentos e tempos de estocagem do sêmen

Tempo	Fração do ejaculado			
	Fração 1		Fração 2	
	MR-A(F1T1)	Glicina-gema(F1T2)	MR-A(F2T1)	Glicina-gema(F2T2)
<b>Sêmen fresco</b>	3,60 ± 0,60 <sup>a</sup>	3,60 ± 0,60 <sup>Aa</sup>	1,10 ± 0,43 <sup>b</sup>	1,10 ± 0,43 <sup>b</sup>
<b>0 horas</b>	4,30 ± 0,60 <sup>a</sup>	3,00 ± 0,60 <sup>ABab</sup>	1,60 ± 0,60 <sup>bc</sup>	0,80 ± 0,60 <sup>c</sup>
<b>12 horas</b>	4,00 ± 0,45 <sup>a</sup>	1,20 ± 0,45 <sup>BCb</sup>	1,10 ± 0,45 <sup>b</sup>	1,00 ± 0,45 <sup>b</sup>
<b>24 horas</b>	4,20 ± 0,40 <sup>a</sup>	1,20 ± 0,40 <sup>BCb</sup>	1,10 ± 0,40 <sup>bc</sup>	0,30 ± 0,40 <sup>c</sup>
<b>36 horas</b>	4,70 ± 0,63 <sup>a</sup>	1,10 ± 0,63 <sup>BCb</sup>	1,20 ± 0,63 <sup>b</sup>	1,20 ± 0,63 <sup>b</sup>
<b>48 horas</b>	3,50 ± 0,37 <sup>a</sup>	1,10 ± 0,37 <sup>BCb</sup>	1,10 ± 0,37 <sup>b</sup>	0,40 ± 0,37 <sup>c</sup>
<b>72 horas</b>	4,20 ± 0,43 <sup>a</sup>	1,00 ± 0,43 <sup>Cb</sup>	2,00 ± 0,43 <sup>b</sup>	1,00 ± 0,43 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha, diferem ( $p < 0,05$ )

<sup>A,B,C</sup> Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna, diferem ( $p < 0,05$ )

As análises estatísticas referentes à tabela 24, estão apresentadas no anexo Ii do Experimento I (página 190 a 193).

Considerando-se que a presença de gotas citoplasmáticas geralmente representa a alteração morfológica mais presente no

ejaculado do varrão, Waberski et al. (1994a) investigaram o efeito das gotas proximais e distais sobre a fertilidade de fêmeas suínas, em um experimento a campo. Neste trabalho, observaram uma correlação negativa entre o percentual de gotas distais e a fertilidade, contradizendo a

hipótese de que estas deprimem menos a fertilidade que as gotas proximais (Hurtgen, 1984, citado por Johnson et al., 2000). Concluíram, ainda, que a presença de gotas citoplasmáticas caracteriza um sério defeito morfológico, de particular importância quando o sêmen armazenado por longo tempo é utilizado para a inseminação, devendo estar associado à menor resistência espermática contra o envelhecimento *in vitro*. Adicionalmente, Waberski et al. (1994a) recomendam que a percentagem total de gota citoplasmática nos ejaculados utilizados para a inseminação artificial não deveria exceder os 15%, especialmente quando o sêmen a ser utilizado é armazenado.

Na tabela 25 verifica-se que os valores máximos referentes aos defeitos totais

encontrados nos espermatozoides nos diferentes tratamentos e tempos de estocagem do sêmen, estiveram próximos do limiar de 20% recomendado como padrão a ser seguido para a utilização de uma dose inseminante (CBRA, 1998; Kuster e Althouse, 1999; Shipley, 1999; Johnson et al., 2000).

Adicionalmente, não observou-se diferenças ( $p > 0,05$ ) para esta variável entre os diferentes tratamentos no sêmen a fresco. Em todos os tratamentos, houve um incremento progressivo ( $p < 0,05$ ) dos percentuais de defeitos totais em decorrência do tempo de armazenamento, com exceção da fração 1 diluída no diluidor MR-A (F1T1).

Tabela 25. Percentual de defeitos totais nos espermatozoides entre os tratamentos nos diferentes tempos

Tempo	Fração do ejaculado			
	Fração 1		Fração 2	
	MR-A(F1T1)	Glicina-gema(F1T2)	MR-A(F2T1)	Glicina-gema(F2T2)
<b>Sêmen fresco</b>	11,40 ± 1,39 <sup>B</sup>	11,40 ± 1,39 <sup>D</sup>	13,00 ± 0,98 <sup>B</sup>	13,00 ± 0,98 <sup>BC</sup>
<b>0 horas</b>	18,80 ± 1,33 <sup>Aa</sup>	10,60 ± 1,33 <sup>Db</sup>	17,70 ± 1,33 <sup>ABa</sup>	10,00 ± 1,33 <sup>Cb</sup>
<b>12 horas</b>	18,50 ± 1,53 <sup>Aa</sup>	12,10 ± 1,53 <sup>Cdb</sup>	17,80 ± 1,53 <sup>ABa</sup>	13,70 ± 1,53 <sup>ABCab</sup>
<b>24 horas</b>	19,00 ± 1,38 <sup>Aa</sup>	13,70 ± 1,38 <sup>BCDb</sup>	19,60 ± 1,38 <sup>ABa</sup>	17,20 ± 1,38 <sup>ABab</sup>
<b>36 horas</b>	19,90 ± 1,55 <sup>A</sup>	16,00 ± 1,55 <sup>ABC</sup>	19,20 ± 1,55 <sup>AB</sup>	18,40 ± 1,55 <sup>AB</sup>
<b>48 horas</b>	20,80 ± 1,62 <sup>A</sup>	16,70 ± 1,62 <sup>AB</sup>	21,70 ± 1,62 <sup>A</sup>	18,40 ± 1,62 <sup>AB</sup>
<b>72 horas</b>	21,70 ± 2,00 <sup>A</sup>	19,00 ± 2,00 <sup>A</sup>	22,90 ± 2,00 <sup>A</sup>	19,00 ± 2,00 <sup>A</sup>

<sup>a,b</sup> Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha, diferem ( $p < 0,05$ )

<sup>A,B,C,D</sup> Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna, diferem ( $p < 0,05$ )

As análises estatísticas referentes à tabela 25, estão apresentadas no anexo Ij do Experimento I (página 193 a 195).

Comparando-se os valores do sêmen a fresco e após 72 horas de estocagem, houve um aumento ( $p < 0,05$ ) do total de patologias para todos os tratamentos.

Após a diluição (0 hora) e nos períodos de 12 e 24 horas de estocagem, observou-se um aumento, nem sempre significativo das patologias totais no sêmen submetido a diluição no diluidor MR-A e mantido a

17°C, em relação ao diluído em diluidor glicina-gema de ovo e armazenado a 5°C. A partir das 36 horas de armazenamento não observou-se influência ( $p > 0,05$ ) do método de conservação nem do tempo de armazenamento do sêmen sobre os percentuais de defeitos totais, quando houve uma estabilização dos valores até o final do experimento, às 72 horas de estocagem.

Tem sido demonstrada a existência de uma correlação negativa entre morfologia espermática e fertilidade, por vários autores. Entretanto, Gadea et al. (2004) realizaram um estudo em condições

comerciais e encontraram uma fraca correlação da fertilidade com alguns defeitos (gota citoplasmática proximal e cauda dobrada), embora sem significancia estatística. Segundo os autores, tal observação poderia decorrer da pré-seleção dos ejaculados utilizados para a preparação das doses inseminantes. Como os ejaculados foram selecionados pela motilidade, e utilizados apenas aqueles apresentando motilidade superior ao valor de referência, haveria uma redução da variabilidade dos parâmetros seminais. Assim, em um estudo anterior (Gadea et al., 1998), quando nenhuma pré-seleção dos ejaculados foi realizada, foram observadas maiores correlações entre anormalidades morfológicas e fertilidade. Diante disso, Gadea et al. (2004) concluíram que a pré-seleção dos ejaculados, realizada sob condições comerciais poderia reduzir essa correlação, como demonstrado na fertilidade *in vitro* (Gadea e Matas, 2000).

De acordo com Alm et al. (2006) o grande número de espermatozoides normalmente utilizados por dose na inseminação suína, torna difícil determinar a real importância

de anormalidades espermáticas específicas em varrões. Contudo, o efeito da morfologia espermática é multiplicado quando a concentração por dose inseminante é reduzida, até que os defeitos espermáticos compensáveis não possam mais ser superados (Althouse et al. 1998; Saacke et al. 2000), levando a uma redução da fertilidade e prolificidade.

## 4.2 EXPERIMENTO II: Fertilidade de fêmeas suínas inseminadas com sêmen oriundo de duas frações do ejaculado, submetidas a dois protocolos de resfriamento à 5°C ou 17°C

### 4.2.1 Características físicas do sêmen e desempenho reprodutivo dos varrões

Nesse experimento foram realizadas 21 coletas de sêmen, de cinco varrões da raça Landrace, estando os dados inerentes às características físicas do sêmen, à preparação das doses inseminantes e resfriamento do sêmen, bem como ao desempenho reprodutivo dos varrões, apresentados na tabela 26.

Tabela 26. Características físicas do sêmen e desempenho reprodutivo dos varrões utilizados no Experimento II, de acordo com a fração do ejaculado utilizado

Parâmetros avaliados	Fração do ejaculado	
	Fração 1 (15 mL)	Fração 2 (restante)
Número de varrões	05	05
Número de ejaculados	21	21
Volume do sêmen (mL)	15,00 ± 0,0	194,43 ± 0,13
Motilidade do sêmen a fresco (%)	73,57 ± 1,15	74,29 ± 0,99
Vigor do sêmen a fresco (0 – 5)	4,40 ± 0,10	4,43 ± 0,08
Nº de spz/mL (x10 <sup>6</sup> )	1414,29 ± 155,49 <sup>a</sup>	208,10 ± 23,75 <sup>b</sup>
Nº de spz móveis/mL (x10 <sup>6</sup> )	1057,62 ± 121,01 <sup>a</sup>	153,71 ± 17,43 <sup>b</sup>
Nº de spz totais/fração (x10 <sup>9</sup> )	21,21 ± 2,33 <sup>b</sup>	37,38 ± 3,79 <sup>a</sup>
Nº de spz móveis/fração(x10 <sup>9</sup> )	15,85 ± 1,81 <sup>b</sup>	27,61 ± 2,73 <sup>a</sup>
Volume de sêmen/dose inseminante (mL)	4,32 ± 0,76 <sup>b</sup>	24,82 ± 2,88 <sup>a</sup>
Volume de diluidor/dose inseminante (mL)	95,68 ± 0,76 <sup>b</sup>	75,18 ± 2,88 <sup>a</sup>
Nº potencial de fêmeas inseminadas	5,28 ± 0,60 <sup>b</sup>	9,20 ± 0,91 <sup>a</sup>
Nº real de fêmeas inseminadas	3,05 ± 0,48	3,14 ± 0,53
Tempo da colheita à pré-diluição (min)	-	-
Tempo da colheita à diluição (min)	17,81 ± 0,81 <sup>b</sup>	22,67 ± 1,00 <sup>a</sup>
Tempo da colheita ao resfriamento (min)	61,14 ± 5,86	55,33 ± 6,19

<sup>a,b</sup> Médias seguidas por letras diferentes, na mesma linha, diferem (p < 0,05)

As análises estatísticas referentes à tabela 26, estão apresentadas no anexo IIc do Experimento II (página 196 a 198).

Observa-se na tabela 26, que o volume da segunda fração encontrado nesse experimento (194,43 mL) foi inferior ao do Experimento I (208,98 mL, tabela 13). Já que os machos utilizados nos dois experimentos foram os mesmos, uma maior pressão na frequência de coletas, neste experimento, resultou em um menor volume do ejaculado total. Embora o volume total do ejaculado encontrado aqui esteja dentro da amplitude normal de 150 a 300 mL (Pinart et al., 1999), Smital (2009) relatou que os varrões apresentam um volume do ejaculado aceitável, após um descanso sexual de três dias; entretanto, atinge um volume normal após um intervalo de cinco dias entre coletas. Desta forma, considerando-se que na maioria das coletas desse experimento não foi possível respeitar o intervalo de cinco dias, essa redução pode ter respondido pela queda do volume total e conseqüentemente da fração 2.

Assim como para o volume, a concentração espermática encontrada aqui também foi inferior à do Experimento I, para ambas as frações. Considerando-se que Smital (2009) relata ser a concentração e o número de espermatozóides totais no ejaculado restabelecidos em 5-7 dias após a última coleta, embora o completo restabelecimento do pool de espermatozóides no ejaculado tenha sido alcançado após uma pausa sexual de 10-11 dias, certamente, a maior frequência de coletas do presente experimento, respondeu pela redução da concentração espermática (tabelas 13 e 26) e do número de espermatozóides totais quando compara-se os dados dos Experimentos I e II, de  $75,1 \times 10^9$  e  $58,59 \times 10^9$ , respectivamente. Comparando-se os dados do número de espermatozóides totais no ejaculado, somando-se as duas frações

( $58,59 \times 10^9$ ) do Experimento II, com os apresentados por Braga (2007), envolvendo machos Landrace da mesma linhagem (DanBred) utilizada aqui, verifica-se um valor inferior no presente experimento, considerando-se o número de  $66,16 \times 10^9$  de espermatozóides totais, apresentado no trabalho citado, quando utilizou-se a coleta total do ejaculado.

O número potencial de fêmeas inseminadas também, neste experimento, diferiu entre as frações ( $p < 0,05$ ), como já havia sido observado, anteriormente, no Experimento I. Em decorrência do menor número de espermatozóides totais e móveis presentes no ejaculado nas duas frações neste experimento, o número potencial de fêmeas a serem inseminadas, nas respectivas frações, também foi menor no Experimento II, quando comparado ao que se observou no Experimento I (tabelas 13 e 26).

De acordo com o volume de sêmen e diluidor necessários para a preparação de uma dose inseminante de  $3 \times 10^9$  de espermatozóides em 100 mL, observados na tabela 26, a taxa de diluição (sêmen:diluidor) encontrada para a fração 1 foi de aproximadamente 1:22 e para a fração 2 de 1:3. Esses valores estão em desacordo com os preconizados como ideal, por diferentes autores, quando deveria ser de 1:5 a 1:15 (Martin Rillo et al., 1994; Ruvalcaba, 1994). Nesse contexto, poderia ser esperado um choque osmótico nos espermatozóides na fração 1, devido a alta taxa de diluição (Flowers, 1996; Levis, 1997), bem como uma redução da viabilidade espermática devido à carência de substratos energéticos e à perda da capacidade tamponante do meio na fração 2, em decorrência de uma taxa de diluição abaixo da recomendada (Flowers, 1996). Contudo, baseando-se no preconizado por Varner et al. (1987), de que o número de células espermáticas por mL de sêmen diluído deveria estar no intervalo de 30 a

50 x 10<sup>6</sup> de espermatozoides por mL de sêmen diluído, as duas frações atenderam tal premissa.

De acordo com as observações de Rozeboom (1999), quanto à coloração

ideal do sêmen, que deveria ser branco leitosa, verifica-se na tabela 27 as diferenças observadas quanto ao aspecto/cor do sêmen a fresco, considerando-se as duas frações coletadas separadamente.

Tabela 27. Influência da fração do ejaculado sobre a cor/aspecto do sêmen *in natura* no Experimento II

Fração do ejaculado	Cor/aspecto do sêmen		
	Leitoso (%)	Soroso-leitoso(%)	Soroso (%)
1	80,95 (17/21)	19,05 (4/21)	0,00
2	23,81 (5/21)	57,14 (12/21)	19,05 (4/21)

Observa-se que em mais de 80% das coletas, a fração 1 apresentou aspecto leitoso em decorrência da alta concentração espermática por mL observada nessa fração. Contudo, nesse experimento, observou-se também a ocorrência de sêmen com aspecto soroso-leitoso nessa fração, o que não tinha sido observado no Experimento I (tabela 14). Embora essa situação tenha ocorrido em cerca de 19,05% (4/21) dos ejaculados, certamente, a maior frequência de coletas dos varrões no Experimento II, respondeu por essa observação. Com relação à fração 2, em 12 de 21 coletas (57%) o sêmen apresentou aspecto soroso-leitoso, em decorrência da baixa concentração espermática por mL de sêmen, dessa fração.

Embora, cerca de 23% (5/21) das coletas envolvendo a fração 2 tenha apresentado um aspecto leitoso, um número aproximado de ejaculados (4/21; 19,05%) apresentou aspecto soroso, indicando baixa concentração, associada a um menor número de espermatozoides totais presentes no ejaculado.

Embora não tenha sido observada diferença aparente no número de aglutinações no sêmen *in natura* de acordo com a fração do ejaculado no Experimento II (tabela 28), vale ressaltar a maior presença de aglutinações em ambas as frações, em relação ao que observou-se no Experimento I (tabela 15).

Tabela 28. Número de aglutinações no sêmen *in natura* de acordo com a fração do ejaculado, no Experimento II

Fração do ejaculado	Número de aglutinações		
	1 a 2 (%)	3 a 5 (%)	≥ 6 (%)
1	57,14 (12/21)	38,10 (8/21)	4,76 (1/21)
2	47,62 (10/21)	47,62 (10/21)	4,76 (1/21)

Não se encontraram na literatura trabalhos associando a frequência de coletas e as frações do ejaculado à presença de aglutinações no sêmen, não sendo possível, portanto, explicar o maior número de aglutinações observadas aqui.

#### 4.2.2 Período de conservação do sêmen

Os períodos médios de estocagem do sêmen resfriado não diferiram entre os tratamentos, para nenhuma das quatro inseminações realizadas (tabela 29), que no entanto, variaram de 14,97 ± 2,89 a 28,51 ± 4,75 horas.

Tabela 29. Períodos de estocagem do sêmen resfriado dos varrões entre os tratamentos, nas quatro inseminações

Intervalo	Períodos médios de conservação do sêmen (horas)			
	F1T1	F1T2	F2T1	F2T2
<b>Colheita-1<sup>a</sup> IA</b>	21,70 ± 2,34	17,86 ± 2,34	18,44 ± 2,34	16,37 ± 2,34
<b>Colheita-2<sup>a</sup> IA</b>	16,62 ± 1,99	16,58 ± 1,99	26,40 ± 1,99	17,89 ± 1,99
<b>Colheita-3<sup>a</sup> IA</b>	14,97 ± 2,89	17,01 ± 2,74	22,18 ± 2,74	23,79 ± 2,74
<b>Colheita-4<sup>a</sup> IA</b>	26,37 ± 4,75	25,42 ± 5,82	22,63 ± 4,75	28,51 ± 4,75

Weitze et al. (1989) recomendam a utilização do sêmen por até 48 horas sem reduzir os índices de fertilidade; citam, no entanto, que quando o sêmen foi armazenado por 48 a 72 horas, as taxas de fertilização diminuíram, mesmo quando as ovulações ocorreram entre 12 e 24 horas após a inseminação. Entretanto, Martinez et al. (1986) demonstraram que o diluidor MR-A foi capaz de manter a mesma média de fertilidade e número de nascidos vivos quando o sêmen foi preservado por até 5 dias. Em outro estudo, Johnson et al. (1988) compararam o diluidor BTS com o MR-A e Modena e não observaram nenhuma diferença entre os diluidores BTS e MR-A, quando as doses inseminantes foram utilizadas por até 4 dias. Embora utilizassem o diluidor BTS, não utilizado nesse experimento, Alexoupoulos et al. (1996) observaram ser esse diluidor eficiente para a conservação do sêmen de varrões, envasado em doses de 100 mL, com concentração de 3 bilhões de espermatozoides, por até 72 horas. No entanto, Hofmo (1991) observou uma redução na taxa de parto com o sêmen diluído em BTS e estocado por 48 horas, em comparação ao estocado no mesmo diluidor por 24 horas.

Com relação ao diluidor glicina-gema de ovo, Foote (2002) ao utilizá-lo manteve o sêmen diluído a 5°C por 48 horas, obtendo uma taxa de parto de 63%, com média de 10,1 leitões nascidos, considerada

insatisfatória diante dos índices reprodutivos alcançados pela grande maioria das ganjas comerciais.

Diante dos resultados apresentados anteriormente, acredita-se que, embora alguns trabalhos assegurem que um tempo de armazenamento do sêmen, superior ao demonstrado nesse experimento, poderia ser utilizado sem prejuízos dos índices reprodutivos, os períodos médios de conservação do sêmen utilizados em todas as inseminações (tabela 29) são considerados suficientes em se tratando da utilização prática, na logística do transporte do sêmen entre granjas, mesmo quando abrangendo maiores distâncias, e se faz necessário a utilização do transporte aéreo.

#### **4.2.3 Características do sêmen diluído e resfriado no momento de cada inseminação artificial**

As características físicas de motilidade e vigor, para cada tratamento, quando da realização das quatro inseminações estão apresentadas nas tabelas 30, 31, 32 e 33. No momento em que as doses eram retiradas do contêiner, uma alíquota era aquecida em banho-maria a 37°C, sendo a motilidade e o vigor do sêmen, de cada dose inseminante, de cada tratamento, avaliados e registrados. Na tabela 30 estão apresentados os dados das características físicas do sêmen no momento da primeira inseminação.

Tabela 30. Efeito da fração do ejaculado e do protocolo de resfriamento, sobre características físicas do sêmen diluído de varrões, no momento da primeira inseminação

Fração do ejaculado	Motilidade espermática(%)		Vigor espermático(0-5)		
	Glicina-gema de ovo	MR-A®	Glicina-gema de ovo	MR-A®	Total
1	65,50 ± 1,69 <sup>Ba</sup>	52,50 ± 1,69 <sup>Bb</sup>	3,80 ± 0,12	3,15 ± 0,12	3,48 ± 0,08 <sup>D</sup>
2	73,50 ± 1,69 <sup>Aa</sup>	69,00 ± 1,69 <sup>Aa</sup>	3,95 ± 0,12	3,75 ± 0,12	3,85 ± 0,08 <sup>C</sup>
<b>Total</b>	-	-	3,88 ± 0,08 <sup>c</sup>	3,45 ± 0,08 <sup>d</sup>	-

<sup>a,b</sup> Médias seguidas na linha por letras diferentes, dentro da mesma variável, diferem (p < 0,05)

<sup>A,B</sup> Médias seguidas na coluna por letras diferentes, dentro da mesma variável, diferem (p < 0,05)

<sup>c,d</sup> Médias seguidas na linha por letras diferentes, dentro da mesma variável diferem (p < 0,05)

<sup>C,D</sup> Médias seguidas na coluna por letras diferentes, dentro da mesma variável diferem (p < 0,05)

As análises estatísticas referentes à tabela 30, estão apresentadas no anexo IId do Experimento II (páginas 198-199).

Observa-se que a motilidade espermática foi influenciada (p<0,05) pelas frações do ejaculado e pelos protocolos de resfriamento do sêmen. Para a fração 1, observa-se que nas doses preparadas utilizando-se o diluidor glicina-gema de ovo e mantidas à 5°C (F1T2), a motilidade foi superior (p<0,05) às das doses diluídas com MR-A e mantidas à 17°C (F1T1). Entretanto, doses preparadas com a fração 2, diluída em glicina-gema de ovo e mantidas à 5°C (F2T2) apresentaram motilidade similar (p>0,05) às das doses diluídas com MR-A e mantidas à 17°C (F2T1). Assim, houve interação (p<0,05) entre os protocolos de resfriamento e a fração do ejaculado, com a fração 2 apresentando motilidade superior à da fração 1, independente do protocolo de resfriamento do sêmen utilizado. Assim, vale ressaltar que o maior valor de motilidade foi observado nas doses do tratamento F2T2 (73,50%), e o menor valor nas doses do tratamento F1T1 (52,50%). O vigor espermático não diferiu entre os tratamentos no momento da primeira inseminação. Contudo, as doses diluídas no diluidor glicina-gema de ovo, independente da fração do ejaculado, apresentaram vigor espermático superior (p<0,05) ao das doses diluídas com MR-A (3,88 e 3,45,

respectivamente). Da mesma forma, as doses oriundas da fração 2 do ejaculado, independentemente do protocolo de resfriamento do sêmen utilizado, apresentaram valor para o vigor espermático superior (p<0,05) ao observado para a fração 1.

Para as características do sêmen, registradas no momento da segunda inseminação, observa-se na tabela 31, que a motilidade espermática não diferiu (p>0,05) entre os tratamentos. Entretanto, quando avaliou-se a motilidade entre as frações, independente do protocolo de resfriamento, verificou-se que a fração 1 apresentou motilidade espermática inferior (p<0,05) à observada na fração 2 (61,00% e 68,75%, respectivamente). Comparando-se os padrões de motilidade entre os protocolos de resfriamento, independente da fração do ejaculado utilizada, verifica-se que as doses de sêmen preparadas com o diluidor de glicina-gema de ovo, apresentaram motilidade superior (p<0,05) às diluídas com o diluidor MR-A (69,25% vs 60,50%, respectivamente). Para o vigor espermático, não se observaram diferenças (p>0,05) entre os tratamentos. Entretanto, quando se compararam os protocolos de resfriamento, independente da fração do ejaculado, as doses diluídas com o diluidor glicina-gema de ovo apresentaram melhor vigor espermático (p<0,05) que as diluídas em MR-A (3,95 vs 3,40).

Tabela 31. Efeito da fração do ejaculado e do protocolo de resfriamento, sobre características do sêmen diluído de varrões, no momento da segunda inseminação

Fração do ejaculado	Motilidade espermática			Vigor espermático		
	Glicina-gema	MR-A®	Total	Glicina-gema	MR-A®	Total
1	64,50 ± 1,88	57,50 ± 1,88	61,00 ± 1,76 <sup>B</sup>	3,75 ± 0,12	3,40 ± 0,12	3,58 ± 0,09
2	74,00 ± 1,88	63,50 ± 1,88	68,75 ± 1,53 <sup>A</sup>	4,15 ± 0,12	3,40 ± 0,12	3,78 ± 0,09
<b>Total</b>	69,25 ± 1,32 <sup>a</sup>	60,50 ± 1,81 <sup>b</sup>	-	3,95 ± 0,09 <sup>c</sup>	3,40 ± 0,09 <sup>d</sup>	-

<sup>a,b</sup> Médias seguidas na linha por letras diferentes, dentro da mesma variável, diferem (p < 0,05)

<sup>A,B</sup> Médias seguidas na coluna por letras diferentes, dentro da mesma variável, diferem (p < 0,05)

<sup>c,d</sup> Médias seguidas na linha por letras diferentes, dentro da mesma variável diferem (p < 0,05)

As análises estatísticas referentes à tabela 31, estão apresentadas no anexo Iie do Experimento II (páginas 199-200).

Observa-se na tabela 32, que no momento da terceira inseminação, a motilidade espermática não diferiu entre os tratamentos (p>0,05). Novamente, observou-se efeito do protocolo de resfriamento utilizado (p<0,05), independente da fração, sendo a motilidade superior nas doses diluídas em glicina-gema de ovo. Observou-se também, influência da fração do ejaculado sobre a motilidade espermática, independente do

protocolo de resfriamento utilizado, sendo o maior valor encontrado (p<0,05) nas doses de sêmen oriundas da fração 2 do ejaculado. Para o vigor espermático, verificou-se diferença (p<0,05) entre os protocolos de resfriamento, independente da fração utilizada, sendo, novamente o maior valor observado (p<0,05) nas doses diluídas no diluidor glicina-gema de ovo. Entretanto, não se observou diferença significativa (p>0,05) quanto ao vigor espermático entre os tratamentos, no momento da terceira inseminação, nem influência da fração do ejaculado.

Tabela 32. Efeito da fração do ejaculado e do protocolo de resfriamento, sobre características do sêmen diluído de varrões, no momento da terceira inseminação

Fração do ejaculado	Motilidade espermática			Vigor espermático		
	Glicina-gema	MR-A®	Total	Glicina-gema	MR-A®	Total
1	67,50 ± 1,66	61,67 ± 1,75	64,74 ± 1,40 <sup>B</sup>	3,80 ± 0,14	3,50 ± 0,14	3,66 ± 0,10
2	71,00 ± 1,66	67,00 ± 1,66	69,00 ± 1,18 <sup>A</sup>	4,00 ± 0,14	3,50 ± 0,14	3,75 ± 0,11
<b>Total</b>	69,25 ± 0,83 <sup>a</sup>	64,47 ± 1,62 <sup>b</sup>	-	3,90 ± 0,09 <sup>c</sup>	3,50 ± 0,10 <sup>d</sup>	-

<sup>a,b</sup> Médias seguidas na linha por letras diferentes, dentro da mesma variável, diferem (p < 0,05)

<sup>A,B</sup> Médias seguidas na coluna por letras diferentes, dentro da mesma variável, diferem (p < 0,05)

<sup>c,d</sup> Médias seguidas na linha por letras diferentes, dentro da mesma variável diferem (p < 0,05)

As análises estatísticas referentes à tabela 32, estão apresentadas no anexo IIf do Experimento II (páginas 200 e 201).

Na tabela 33 estão apresentados os dados das características físicas do sêmen no momento da quarta inseminação. Verifica-se que não houve diferenças (p>0,05) entre os tratamentos, no que se refere às variáveis motilidade e vigor espermáticos no

momento da quarta inseminação. Entretanto, a motilidade espermática foi influenciada (p<0,05) pela fração do ejaculado, independente do protocolo de resfriamento utilizado, sendo que as doses de sêmen oriundas da fração 2 apresentaram maior valor (p<0,05) que as doses oriundas da fração 1 (67,50% vs 54,00%, respectivamente).

Tabela 33. Efeito da fração do ejaculado e do protocolo de resfriamento, sobre características físicas do sêmen diluído de varrões, no momento da quarta inseminação

Fração do ejaculado	Motilidade espermática			Vigor espermático		
	Glicina-gema	MR-A®	Total	Glicina-gema	MR-A®	Total
1	60,00 ± 4,08	50,00 ± 3,33	54,00 ± 3,32 <sup>B</sup>	3,25 ± 0,40	3,00 ± 0,33	3,13 ± 0,26
2	71,67 ± 3,33	63,33 ± 3,33	67,50 ± 2,81 <sup>A</sup>	4,00 ± 0,33	3,33 ± 0,33	3,67 ± 0,23
<b>Total</b>	67,00 ± 4,06	56,67 ± 3,33	-	3,63 ± 0,26	3,17 ± 0,23	-

<sup>A,B</sup> Médias seguidas na coluna por letras diferentes, dentro da mesma variável, diferem ( $p < 0,05$ )

As análises estatísticas referentes à tabela 33, estão apresentadas no anexo IIg do Experimento II (páginas 201 e 202).

De acordo com Johnson et al. (2000) e Flowers (1997) o sêmen deve apresentar motilidade mínima de 60% para ser utilizado. Dessa forma, observa-se nas tabelas 30, 31 e 33 que a motilidade do sêmen oriundo da fração 1 do ejaculado, diluída no diluidor MR-A e armazenada à temperatura de 17°C (F1T1), no momento da primeira, segunda e quarta inseminações, respectivamente, estava abaixo dos 60% recomendados pelos autores. Entretanto, é importante ressaltar que os autores consideram este valor de motilidade (60%) para o sêmen fresco, ou seja, um requisito mínimo para que um ejaculado fosse processado ou descartado após a coleta, diferentemente dos dados citados acima, envolvendo a motilidade do sêmen diluído e resfriado. Além disso, vale ressaltar que todos os ejaculados utilizados no presente experimento, apresentavam motilidade superior a 60% após a coleta, como recomendado pelos autores citados.

#### 4.2.4 Parâmetros de controle de fêmeas suínas inseminadas com sêmen diluído e resfriado a 5°C ou 17°C

Os parâmetros de controle das fêmeas pertencentes a cada tratamento, registrados durante a fase experimental, os quais informam a uniformidade entre os mesmos, estão apresentados na tabela 34.

Observa-se na tabela 34, que apenas a duração da inseminação, ou seja, o tempo gasto em minutos, para que todo conteúdo da bisnaga fosse inseminado, diferiu entre os tratamentos, na segunda e terceira inseminações, não sendo observado, entretanto, nenhuma relação entre o tratamento e a duração da inseminação.

Observa-se que o IDE variou de 76,07 ± 5,33 a 87,77 ± 5,33 horas, o que corresponde a aproximadamente 3,5 dias. Desta forma, o IDC observado está de acordo com o descrito por Kummer et al., (2003) para a maioria das granjas tecnificadas, de aproximadamente 4 a 6 dias; além disso, Castagna et al. (2001), verificaram uma maior frequência de porcas (2<sup>a</sup> a 8<sup>a</sup> ordens de parto) apresentando um IDC no período de 3 a 4 dias após o desmame.

Tabela 34. Parâmetros de controle de fêmeas suínas, inseminadas com sêmen diluído e resfriado a 5° ou 17°C, em contêiner especial

Parâmetros avaliados	Tratamentos			
	F1T1	F1T2	F2T1	F2T2
Número de porcas	10	10	10	10
Número de varrões	05	05	05	05
Ordem de parto	3,60 ± 0,16	3,50 ± 0,16	3,70 ± 0,16	3,60 ± 0,16
IDE (horas)	76,07 ± 5,33	85,74 ± 5,33	86,21 ± 5,33	87,77 ± 5,33
Duração do estro (DE) (horas)	58,13 ± 2,89	63,85 ± 2,89	63,99 ± 2,89	60,82 ± 2,89
Cio – 1ª IA (horas)	18,62 ± 0,71	18,72 ± 0,71	19,31 ± 0,71	18,87 ± 0,71
Colheita – 1ª IA (horas)	21,70 ± 2,34	17,86 ± 2,34	18,44 ± 2,34	16,37 ± 2,34
Duração da 1ªIA (minutos)	5,33 ± 0,53	6,62 ± 0,53	4,54 ± 0,53	6,77 ± 0,53
Cio – 2ªIA (horas)	30,33 ± 0,76	30,85 ± 0,76	31,05 ± 0,76	31,22 ± 0,76
Colheita – 2ªIA (horas)	16,62 ± 1,99 <sup>b</sup>	16,58 ± 1,99 <sup>b</sup>	26,40 ± 1,99 <sup>a</sup>	17,89 ± 1,99 <sup>b</sup>
Duração da 2ªIA (minutos)	6,54 ± 0,68 <sup>ab</sup>	6,26 ± 0,68 <sup>ab</sup>	4,86 ± 0,68 <sup>b</sup>	7,88 ± 0,68 <sup>a</sup>
Intervalo 1ª – 2ª IA (horas)	11,71 ± 0,47	12,14 ± 0,47	11,74 ± 0,47	12,36 ± 0,47
Cio – 3ªIA (horas)	42,04 ± 1,18	43,39 ± 1,12	43,56 ± 1,12	42,88 ± 1,12
Colheita – 3ªIA (horas)	14,97 ± 2,89	17,01 ± 2,74	22,18 ± 2,74	23,79 ± 2,74
Duração da 3ªIA (minutos)	7,49 ± 0,60 <sup>a</sup>	6,13 ± 0,57 <sup>ab</sup>	5,50 ± 0,57 <sup>b</sup>	6,91 ± 0,57 <sup>ab</sup>
Intervalo 2ª – 3ª IA (horas)	11,90 ± 0,96	12,65 ± 0,91	12,51 ± 0,91	11,66 ± 0,91
Cio – 4ªIA (horas)	66,98 ± 1,46	65,60 ± 1,78	67,11 ± 1,46	66,35 ± 1,46
Colheita – 4ªIA (horas)	26,37 ± 4,75	25,42 ± 5,82	22,63 ± 4,75	28,51 ± 4,75
Duração da 4ªIA (minuto)	5,92 ± 0,99	6,40 ± 1,21	5,81 ± 0,99	5,07 ± 0,99
Intervalo 3ª – 4ªIA (horas)	24,96 ± 0,71	24,53 ± 0,87	23,94 ± 0,71	23,75 ± 0,71
Última IA-final do cio (horas)	9,61 ± 2,10	15,45 ± 2,10	13,2 ± 2,10	10,82 ± 2,10
Número de Inseminações	3,20 ± 0,16	3,20 ± 0,16	3,30 ± 0,16	3,30 ± 0,16

<sup>a,b</sup> Médias seguidas por letras diferentes, na mesma linha, diferem (p < 0,05)

As análises estatísticas referentes à tabela 34, estão apresentadas no anexo III do Experimento II (páginas 202 a 206).

Na tabela 34, observa-se que a DE variou de 58,13 ± 2,89 a 63,99 ± 2,89 horas. Possivelmente, como não houve diferença no IDE entre os tratamentos, também não se observaram diferenças na duração do estro entre os mesmos, em virtude da literatura ter estabelecido uma relação entre essas variáveis (Soede and Kemp, 1997). Os valores encontrados para a duração do estro (tabela 34) estão de acordo com os verificados na literatura, compreendendo um período entre 50 e 60 horas (Weitze et al., 1994; Soede et al., 1995a), embora possa haver uma grande amplitude para esta característica, como a observada por Soede et al. (2000), de 31 a 65 horas e por outros autores descritos na tabela 5, da revisão de literatura, apresentada aqui.

Sabe-se que a genética (Rydhmer, 2000) e a ordem de parto (Maffili et al. 2000) podem influenciar as variáveis IDE e DE. Entretanto, nesse experimento, somente foram utilizadas fêmeas de uma única linhagem (DB25<sup>®</sup>), e pequena variação na ordem de parto (somente 3ª e 4ª) o que proporcionou grande uniformidade entre os tratamentos.

De acordo com o protocolo de inseminação preconizado nesse trabalho, que constou de três inseminações realizadas a intervalos de 12 horas, com uma quarta inseminação, 24 horas após a terceira, dependendo de estar a fêmea ainda em estro, observa-se na tabela 34 que os intervalos entre a primeira e segunda, segunda e terceira e terceira e quarta inseminações, respeitaram o protocolo em todos os tratamentos.

Consultando-se as tabelas 34 e 41, verifica-se que não houve efeito da fração do ejaculado nem do protocolo de resfriamento do sêmen sobre os parâmetros de controle e de resultados avaliados, nem se observou interação entre a fração do ejaculado e protocolo de resfriamento. Assim, a única diferença ( $p < 0,05$ ) verificada entre os tratamentos e já mencionada anteriormente envolveu a duração da inseminação artificial (tabela 34).

Diante do exposto anteriormente, os dados foram agrupados de forma a estudar o efeito da fração do ejaculado sobre os parâmetros de controle (tabela 36) e de resultados (tabela 42), independente de protocolo de resfriamento. Por outro lado, também se agruparam os dados visando estudar a influência do protocolo de resfriamento sobre os parâmetros de controle (tabela 35) e de resultados (tabela 43), independente da fração do ejaculado.

Na tabela 35, observa-se que também aqui, apenas a variável duração da IA (na primeira IA) diferiu ( $p < 0,05$ ) entre os grupos. Na tabela 36, o intervalo entre a colheita e o momento da terceira IA diferiu ( $p < 0,05$ ) entre os grupos, sendo maior para a fração 2. Entretanto, vale salientar que quando os tratamentos foram apresentados separadamente (tabela 29) não houve diferença ( $p > 0,05$ ) quanto ao período da colheita do sêmen à IA para nenhuma das inseminações, entre os tratamentos.

Para as variáveis IDC e DE nas tabelas 35 e 36, observa-se que os dados estão de acordo com os encontrados na literatura, como citado anteriormente.

As análises estatísticas referentes à tabela 35, estão apresentadas no anexo III do Experimento II (páginas 206 a 208).

Tabela 35. Parâmetros de controle de fêmeas suínas inseminadas com sêmen diluído e resfriado a 5° ou 17°C, independentemente da fração do ejaculado

Parâmetros Avaliados	Protocolos de resfriamento do sêmen	
	Resfriamento a 17°C (MR-A®)	Resfriamento a 5°C (glicina-gema)
Número de porcas	20	20
Número de varrões	05	05
Ordem de parto	3,65 ± 0,11	3,55 ± 0,11
IDC (horas)	81,14 ± 3,77	86,76 ± 3,77
Duração do estro (DE) (horas)	61,06 ± 2,04	62,34 ± 2,04
Cio – 1ªIA (horas)	18,96 ± 0,50	18,79 ± 0,50
Colheita – 1ªIA (horas)	20,07 ± 1,65	17,12 ± 1,65
Duração da 1ªIA (minutos)	4,94 ± 0,33 <sup>b</sup>	6,69 ± 0,41 <sup>a</sup>
Cio – 2ªIA (horas)	30,69 ± 0,54	31,04 ± 0,54
Intervalo 1ª – 2ªIA (horas)	11,72 ± 0,34	12,25 ± 0,34
Cio – 3ªIA (horas)	42,80 ± 0,82	43,14 ± 0,79
Colheita – 3ªIA (horas)	18,77 ± 1,75	20,40 ± 2,33
Intervalo 2ª – 3ªIA (horas)	12,20 ± 0,66	12,15 ± 0,64
Cio – 4ªIA (horas)	67,05 ± 1,03	65,97 ± 1,15
Colheita – 4ªIA (horas)	24,50 ± 3,36	26,97 ± 3,76
Duração da 4ªIA (minutos)	5,87 ± 0,70	5,73 ± 0,78
Intervalo 3ª – 4ªIA (horas)	24,45 ± 0,50	24,14 ± 0,56
Última IA – final do cio (horas)	11,43 ± 1,19	13,13 ± 1,49
Número de inseminações	3,25 ± 0,11	3,25 ± 0,11

<sup>a,b</sup> Médias seguidas de letras diferentes, na mesma linha, diferem ( $p < 0,05$ )

Tabela 36. Parâmetros de controle de fêmeas suínas, inseminadas com sêmen oriundo de duas frações do ejaculado, independentemente do protocolo de resfriamento utilizado (5 ou 17°C)

Parâmetros Avaliados	Frações do ejaculado	
	Fração 1 (15 mL)	Fração 2 (restante do ejaculado)
Número de porcas	20	20
Número de varrões	05	05
Ordem de parto	3,55 ± 0,11	3,65 ± 0,11
IDC (horas)	80,91 ± 3,77	86,99 ± 3,77
Duração do estro (DE) (horas)	60,99 ± 2,04	62,41 ± 2,04
Cio – 1ªIA (horas)	18,67 ± 0,50	19,09 ± 0,50
Colheita – 1ªIA (horas)	19,78 ± 1,65	17,41 ± 1,65
Duração da 1ªIA (minutos)	5,97 ± 0,37	5,66 ± 0,37
Cio – 2ªIA (horas)	30,59 ± 0,54	31,14 ± 0,54
Intervalo 1ª – 2ªIA (horas)	11,92 ± 0,34	12,05 ± 0,34
Cio – 3ªIA (horas)	42,71 ± 0,82	43,22 ± 0,79
Colheita – 3ªIA (horas)	16,04 ± 2,14 <sup>b</sup>	22,99 ± 1,69 <sup>a</sup>
Intervalo 2ª – 3ªIA (horas)	12,27 ± 0,66	12,08 ± 1,64
Cio – 4ªIA (horas)	66,29 ± 1,15	66,73 ± 1,03
Colheita – 4ªIA (horas)	25,89 ± 3,76	25,57 ± 3,36
Duração da 4ªIA (minutos)	6,16 ± 0,78	5,44 ± 0,70
Intervalo 3ª – 4ªIA (horas)	24,74 ± 0,56	23,84 ± 0,50
Última IA – final do cio (horas)	12,53 ± 1,49	12,03 ± 1,49
Número de inseminações	3,20 ± 0,11	3,30 ± 0,11

<sup>a,b</sup> Médias seguidas de letras diferentes, na mesma linha, diferem (p < 0,05)

As análises estatísticas referentes à tabela 36, estão apresentadas no anexo IIj do Experimento II (página 208 a 211).

Entretanto, as variáveis colheita – 2ªIA, duração da 2ªIA e duração da 3ªIA, não puderam ser apresentadas nas tabelas 35 e

36, em virtude da presença de interação significativa entre protocolo de resfriamento e fração do ejaculado para essas variáveis, sendo assim, esses dados estão apresentados separadamente na tabela 37.

Tabela 37. Intervalo de tempo da colheita do sêmen à inseminação artificial e a duração da mesma, considerando-se a fração do ejaculado e o protocolo de resfriamento do sêmen

Fração ejaculado	Colheita – 2ªIA(horas)		Duração da 2ªIA(min)		Duração da 3ªIA(min)	
	Glicina-gema	MR-A®	Glicina-gema	MR-A®	Glicina-gema	MR-A®
1	16,58 ± 1,99 <sup>b</sup>	16,62 ± 1,99 <sup>b</sup>	6,26 ± 0,68 <sup>cd</sup>	6,54 ± 0,68 <sup>cd</sup>	6,13 ± 0,57 <sup>ef</sup>	7,49 ± 0,60 <sup>e</sup>
2	17,89 ± 1,99 <sup>b</sup>	26,40 ± 1,99 <sup>a</sup>	7,88 ± 0,68 <sup>c</sup>	4,86 ± 0,68 <sup>d</sup>	6,91 ± 0,57 <sup>ef</sup>	5,50 ± 0,57 <sup>f</sup>

<sup>a,b,c,d,e,f</sup> Médias seguidas de letras diferentes, dentro da mesma variável, diferem (p < 0,05)

As análises estatísticas referentes à tabela 37, estão apresentadas no anexo III do Experimento II (páginas 211-212).

Dessa forma, observa-se na tabela 37 que houve diferença (p<0,05) para todas as variáveis apresentadas, entre os

tratamentos. Assim, para o tempo da colheita à 2ªIA, observa-se que o maior período de tempo ocorreu nas doses inseminantes oriundas da fração 2 do ejaculado, diluídas no diluidor MR-A e armazenadas a 17°C (26,40 ± 1,99 horas). Para a variável duração da 2ª IA em

minutos, o maior valor foi observado para as doses envolvendo a fração 2 do ejaculado, diluídas em glicina-gema de ovo e armazenadas 5°C, que diferiu ( $p < 0,05$ ), das doses oriundas da fração 2 e diluídas em MR-A® à 17°C, que apresentaram o menor valor ( $4,86 \pm 0,68$  minutos). Quanto à duração da 3ª IA, o maior valor foi encontrado para as doses oriundas da fração 1 do ejaculado, diluídas em MR-A® e preservadas à 17°C ( $7,49 \pm 0,60$  minutos) enquanto o menor valor foi observado para

as oriundas da fração 2 do ejaculado, diluídas no mesmo diluidor ( $5,50 \pm 0,57$  minutos), os quais diferiram entre si ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.4.1 Manifestação do cio

O período de manifestação do cio ao longo do dia, para as fêmeas utilizadas no experimento, por tratamento, está apresentado na tabela 38.

Tabela 38. Frequência de manifestação do cio em porcas, ao longo do dia, por tratamento

Tratamento	Manifestação do cio					
	Manhã		Tarde		Noite	
<b>F1T1</b>	4/10	40,00%	4/10	40,00%	2/10	20,00%
<b>F1T2</b>	4/10	40,00%	3/10	30,00%	3/10	30,00%
<b>F2T1</b>	3/10	30,00%	5/10	50,00%	2/10	20,00%
<b>F2T2</b>	6/10	60,00%	2/10	20,00%	2/10	20,00%
<b>Total</b>	17/40	42,50%	14/40	35,00%	9/40	22,50%

As análises estatísticas referentes à tabela 38, estão apresentadas no anexo II m do Experimento II (página 212).

Observa-se que não houve diferenças ( $p > 0,05$ ) quanto aos períodos de manifestação do cio das fêmeas entre os tratamentos. Entretanto, um maior número de fêmeas manifestou o cio durante o dia (77,5%) em relação às apresentando cio à noite (22,5%). Embora Burger (1952) verificou percentuais semelhantes entre fêmeas apresentando cio durante o dia (49,08%) e à noite (52,56%), os dados apresentados aqui estão de acordo com Braga (2007) que encontrou 67,44% das fêmeas apresentando cio durante o dia e 32,56% apresentando cio pela noite.

#### 4.2.4.2 Intervalo do início do cio à inseminação

De acordo com os dados apresentados na tabela 34, observa-se que o intervalo entre o início do cio e as inseminações artificiais, não diferiu ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos para nenhuma das quatro inseminações.

Sendo assim, pode-se concluir que todas as fêmeas foram inseminadas em momentos similares entre os tratamentos, não sendo esta uma fonte de variação a ser considerada na avaliação da performance reprodutiva das fêmeas.

#### 4.2.4.3 Número médio de inseminações

Observa-se na tabela 34 que o número médio de inseminações não diferiu ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos, variando entre  $3,10 \pm 0,16$  à  $3,30 \pm 0,16$  inseminações por ciclo. Como não houve diferenças entre os tratamentos, no que se refere ao IDC e a DE (tabela 34), pode-se concluir serem esses os principais fatores responsáveis pela ausência de significância quanto ao número de inseminações utilizadas por tratamento. As múltiplas inseminações durante o estro é um procedimento padrão utilizado na maioria das granjas, devido à duração relativamente longa do cio, com horários de ovulação muito variáveis do ponto de vista individual e de rebanho. Entretanto, atualmente existe uma grande variedade de protocolos envolvendo o momento ideal

para realizarem-se inseminações em fêmeas suínas, o que resulta em diferentes médias, no que se refere ao número de inseminações/fêmea coberta.

De acordo com Crabo e Dial (1992) uma dupla inseminação aumenta a taxa de parto de 8 a 12% e o tamanho da leitegada em 0,2 leitões, e ainda, uma terceira inseminação pode oferecer uma leve vantagem nos índices reprodutivos (Tilton and Cole, 1982). Entretanto, LaPierre (1994), citado por Rozeboom et al. (1997) sugere que três inseminações em intervalos de 24 horas durante o estro, pode ser prejudicial à fertilidade e aumentar a incidência de descarga vaginal. Segundo Rozeboom et al.

(1997), uma redução na fertilidade e no tamanho da leitegada é observada, quando a última de múltiplas inseminações é realizada durante o final do estro ou no metaestro. Neste contexto, Braga et al. (2009b) inseminaram 70 fêmeas utilizando-se do mesmo protocolo de observação de cio e inseminação apresentados nesse experimento, concluindo que fêmeas submetidas a quatro inseminações artificiais por estro responderam com menor taxa de prenhes, com uma redução de 16,45%.

Na tabela 39, está apresentada a distribuição do número de inseminações realizadas por tratamento nesse experimento.

Tabela 39. Distribuição do número de inseminações artificiais realizadas por fêmea e por tratamento

Tratamento	Número de Inseminações			
	2	3	4	Total
<b>F1T1</b>	01	06	03	10
<b>F1T2</b>	00	08	02	10
<b>F2T1</b>	00	07	03	10
<b>F2T2</b>	00	07	03	10
<b>Total</b>	01 (2,5%)	28 (70,00%)	11 (27,5%)	40 (100%)

As análises estatísticas referentes à tabela 39, estão apresentadas no anexo II do Experimento II (página 212).

Observa-se na tabela 39 que não houve diferença ( $p < 0,05$ ) no número de inseminações realizadas em cada tratamento. Na maioria das fêmeas (70,00%) foram realizadas três inseminações, sendo que apenas uma fêmea, pertencente ao grupo F1T1, não aceitou a terceira inseminação. Verifica-se ainda que 27,5% das fêmeas aceitaram a quarta dose, 24 horas após a terceira inseminação.

Entretanto, no presente experimento, diante do número de fêmeas inseminadas, não foi possível relacionar o número de inseminações à taxa de gestação, como relatado por Braga et al. (2009b) que

verificaram uma redução de 16,45% na taxa de gestação das fêmeas que receberam quatro inseminações por estro. Neste sentido, Rozeboom et al. (1997), verificaram uma redução na taxa de parto de fêmeas de primeira e segunda ordens de parto (23 e 22%, respectivamente) e no tamanho da leitegada de 1,1 leitões por leitegada, independente da ordem de parto, quando a última de múltiplas inseminações foi realizada durante o final do estro ou no metaestro.

#### **4.2.5 Fertilidade de fêmeas suínas inseminadas com sêmen diluído e resfriado a 5°C ou 17°C em contêiner especial**

O alto custo dos experimentos *in vivo*, tendo como objetivo a avaliação dos efeitos dos tratamentos seminais sobre a fertilidade

das fêmeas, tem limitado em muito sua execução. Dessa forma, muitos trabalhos têm procurado associar a manutenção das características espermáticas *in vitro*, após diferentes tratamentos, como prova de sua eficiência (Palhares, 1997). Entretanto, não existe um único teste ou conjunto dos mesmos que seja capaz de garantir a retenção do poder fecundante das células espermáticas submetidas a um dado tratamento. Contudo, têm-se como maior prova conclusiva da manutenção de uma boa fertilidade, qualquer que seja o tratamento a que a célula espermática foi submetida, a inseminação das fêmeas com avaliação das taxas de gestação e das

características de leitegada (nascidos totais, nascidos vivos, natimortos e mumificados). Dessa forma, pretendeu-se no presente experimento, avaliar a capacidade fecundante dos espermatozoides submetidos aos tratamentos aqui propostos. Assim, os dados de fertilidade das fêmeas inseminadas por tratamento, estão apresentados na tabela 41.

De acordo com o modelo proposto (tabela 40) observa-se que a fertilidade das porcas, não foi influenciada ( $p>0,05$ ) pelos tratamentos, pela fração e nem pelo diluidor utilizados.

Tabela 40. Efeito dos tratamentos, da fração e do diluidor sobre a fertilidade de porcas inseminadas com sêmen diluído e resfriado (Qui-quadrado)

Fonte de Variação	Nível de probabilidade
<b>Tratamentos</b>	0,097
<b>Fração</b>	0,147
<b>Diluidor</b>	0,147

Observa-se na tabela 41, que não houve diferenças ( $p>0,05$ ) entre as taxas de gestação e características das leitegadas entre os tratamentos. Das 40 fêmeas inseminadas, apenas duas, pertencentes ao tratamento F2T2 (fração 2 do ejaculado diluída em glicina-gema de ovo e preservada à 5°C), retornaram ao estro no

período de 17 a 30 dias após a cobertura, sendo uma aos 23 dias e a outra aos 29 dias após a última inseminação. As outras fêmeas mantiveram a gestação até o parto (taxa de parto de 100%), não havendo qualquer descarte por problemas reprodutivos ou não reprodutivos.

Tabela 41. Efeito da fração do ejaculado e do protocolo de resfriamento do sêmen diluído de varrões sobre a fertilidade de porcas inseminadas

Parâmetros avaliados	Frações do ejaculado			
	Fração 1 (15 mL)		Fração 2 (restante do ejaculado)	
	MR-A (17°C)	Glicina-gema (5°C)	MR-A (17°C)	Glicina-gema (5°C)
<b>Ordem de parto</b>	3,60 ± 0,16	3,50 ± 0,16	3,70 ± 0,16	3,70 ± 0,16
<b>Taxa gestação (%)</b>	100,00 (10/10)	100,00 (10/10)	100,00 (10/10)	80,00 (8/10)
<b>Leitões nascidos totais</b>	16,30 ± 1,21	12,80 ± 1,21	14,90 ± 1,21	14,13 ± 1,35
<b>Leitões nascidos vivos</b>	15,00 ± 1,06	11,60 ± 1,06	13,50 ± 1,06	12,14 ± 1,27
<b>Leitões natimortos</b>	0,30 ± 0,29	0,90 ± 0,29	1,10 ± 0,29	1,00 ± 0,35
<b>Leitões mumificados</b>	1,00 ± 0,30	0,30 ± 0,30	0,30 ± 0,30	0,63 ± 0,33

As análises estatísticas referentes à tabela 41, estão apresentadas no anexo IIo do Experimento II (página 213).

Vale ressaltar, que uma das fêmeas do grupo F2T2 (fração 2 do ejaculado diluída em glicina-gema de ovo a 5°C) morreu no momento do parto, antes que nenhum leitão tivesse nascido. Dessa forma, realizou-se a

sua necropsia, visando-se registrar o número de leitões totais e a presença de fetos mumificados, não sendo possível, registrar o número de nascidos vivos e natimortos, como mencionado anteriormente. Portanto, para o cálculo da média de leitões nascidos vivos e natimortos no grupo F2T2, desconsiderou-se essa fêmea, realizando-se o cálculo com os registros das sete fêmeas restantes nesse grupo.

Como mencionado anteriormente, não havendo influência ( $p > 0,05$ ) da fração do ejaculado ou do protocolo de resfriamento sobre as taxas de concepção e as características das leitegadas, entre os

tratamentos, agrupou-se os dados de forma a estudar isoladamente o efeito da fração do ejaculado (tabela 42) ou do protocolo de resfriamento (tabela 43), sobre as variáveis mencionadas anteriormente. Assim, observa-se na tabela 42 que a fração do ejaculado não influenciou ( $p > 0,05$ ) a taxa de gestação nem as características das leitegadas, quando comparadas entre si, independentemente do protocolo de resfriamento utilizado.

Diante desses resultados, as duas frações do ejaculado poderiam ser utilizadas para a preparação das doses inseminantes, sem prejuízo à fertilidade das fêmeas inseminadas.

Tabela 42. Efeito da fração do ejaculado sobre a fertilidade de porcas inseminadas com sêmen diluído e resfriado

Parâmetros avaliados	Frações do ejaculado	
	Fração 1 (15 mL)	Fração 2 (restante)
Ordem de parto	3,55 ± 0,11	3,70 ± 0,11
Taxa de gestação (%)	100,00 (20/20)	90,00 (18/20)
Leitões nascidos totais	14,55 ± 0,90	14,56 ± 0,90
Leitões nascidos vivos	13,30 ± 0,82	12,94 ± 0,81
Leitões natimortos	0,60 ± 0,17	1,06 ± 0,26
Leitões mumificados	0,65 ± 0,26	0,44 ± 0,15

As análises estatísticas referentes à tabela 42, estão apresentadas no anexo IIp do Experimento II (página 214).

Entretanto, quando comparou-se os efeitos do protocolo de resfriamento do sêmen,

independentemente da fração utilizada, verificou-se uma superioridade ( $p < 0,05$ ) do protocolo incluindo a diluição do sêmen no diluidor MR-A e manutenção do sêmen a 17°C, quanto ao número de leitões nascidos vivos (tabela 43).

Tabela 43. Efeito do protocolo de resfriamento do sêmen sobre a fertilidade de porcas inseminadas

Parâmetros avaliados	Protocolo de Resfriamento do sêmen	
	MR-A (17°C)	Glicina-gema (5°C)
Ordem de parto	3,65 ± 0,11	3,60 ± 0,11
Taxa de gestação (%)	100,00 (20/20)	90,00 (18/20)
Leitões nascidos totais	15,60 ± 0,88	13,39 ± 0,85
Leitões nascidos vivos	14,25 ± 0,79 <sup>a</sup>	11,82 ± 0,73 <sup>b</sup>
Leitões natimortos	0,70 ± 0,23	0,94 ± 0,20
Leitões mumificados	0,65 ± 0,26	0,44 ± 0,15

<sup>a,b</sup> Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha, diferem ( $p < 0,05$ ).

As análises estatísticas referentes à tabela 43, estão apresentadas no anexo IIq do Experimento II (páginas 214 e 215).

Entretanto, dois fatores devem ser considerados, antes de se excluir a utilização do diluidor à base de gema de ovo de futuros experimentos ou mesmo da rotina das granjas. Primeiro, embora houvesse uma tendência para o diluidor MR-A, não se observou qualquer diferença ( $p>0,05$ ) na taxa de gestação e número de leitões nascidos totais, entre os protocolos utilizados. Dessa forma, outros fatores relacionados ao momento do parto, como distocias e interferência humana ao parto, podem influenciar no número de leitões nascidos vivos, não sendo uma variável exclusivamente influenciada pela qualidade espermática à inseminação. Segundo, é importante salientar que as doses diluídas no diluidor glicina-gema de ovo foram resfriadas a 5°C, ou seja, um desafio muito maior às células espermáticas.

Principalmente, em se tratando da espécie suína, vale enfatizar a grande sensibilidade de seus espermatozoides às variações de temperatura e conseqüentemente, às alterações da membrana plasmática dos mesmos. Vale salientar a taxa de gestação de 90% associada a um número de nascidos totais de  $13,39 \pm 0,85$  e finalmente um número médio de leitões nascidos vivos de  $11,82 \pm 0,73$  (tabela 43), que em si não podem ser considerados índices insatisfatórios. Por outro lado, pensando-se nos benefícios que o resfriamento e transporte do sêmen diluído a 5°C pode trazer, em decorrência da redução do metabolismo espermático e inibição do crescimento bacteriano, viabilizando um maior tempo de armazenamento, justifica novos experimentos visando o transporte do sêmen entre granjas, em dias pré-estabelecidos, notadamente no verão, quando as altas temperaturas ambientais modificam as temperaturas finais de estocagem, especialmente dos sistemas de

resfriamento passivo. Estudos anteriores realizados com a gema de ovo, demonstraram que essa macromolécula possui diferentes fatores que permitem à célula espermática resistir à condições adversas durante a estocagem e, principalmente, ao choque térmico (Lasley e Mayer, 1944). Sabe-se, ainda, que durante o choque térmico há perda de fosfolipídios da membrana (Cerolini et al., 2000), podendo a gema de ovo prevenir esta perda ou modular os efeitos prejudiciais da mesma.

Os dados de fertilidade e características das leitegadas apresentados no presente experimento utilizando-se as doses inseminantes diluídas no diluidor de glicina-gema de ovo e resfriadas a 5°C, são superiores aos encontrados por Braga et al. (2009a). Naquele experimento, os autores obtiveram uma taxa de gestação de 77,14% com o sêmen diluído em glicina-gema e estocado a 5°C, no mesmo contêiner utilizado no presente experimento, com um número médio de leitões nascidos totais de 10,72 e nascidos vivos de 10,12 leitões. Da mesma forma, Foote (2002) utilizou o sêmen diluído no mesmo diluidor à base de gema de ovo, resfriado a 5°C e preservado por 48 horas para inseminar 70 leitões e 55 porcas, obtendo uma média de 10,1 leitões nascidos diante de uma taxa de parto de 63%.

Kasuya e Kawabe (1977) obtiveram uma média de 10,2 leitões nascidos vivos quando inseminaram 17 fêmeas múltiparas com sêmen resfriado a 5°C. Da mesma forma, Park et al. (1996) utilizaram o sêmen diluído em um diluidor lactose-gema de ovo com 2% de glicerol, preservado por 6 a 7 dias a 5°C e obtiveram uma taxa de parto de 85%, com 10,4 leitões nascidos vivos por leitegada.

Levando-se em conta as variações do período de estocagem do sêmen nos diferentes estudos, verifica-se que os dados

encontrados no presente experimento, com relação à taxa de gestação e número de leitões nascidos, utilizando o sêmen diluído e estocado a 5°C, são superiores aos encontrados na literatura, embora utilizando um curto período de estocagem, variando de 16,58±1,99 à 26,97±3,76 horas.

Com relação aos resultados obtidos utilizando-se as doses de sêmen diluídas no diluidor MR-A e armazenadas a 17°C, os dados do presente experimento são similares aos obtidos por Braga et al. (2009a) quando observou-se uma taxa de parto de 97,14% e número de leitões nascidos totais e vivos de 14,87 e 13,26, respectivamente, sendo o sêmen armazenado à 17°C por 18,39 horas. Da mesma forma, Dimitrov et al. (2009) relataram uma taxa de parto de 94,44% ao utilizarem o sêmen diluído em MR-A a 17°C, por até 12 horas após a coleta. Em estudos realizados no Brasil, Costi (2003) comparando doses inseminantes diluídas nos diluidores BTS e Androhep, e armazenadas a 17°C por até 48 horas, encontraram uma taxa de parto de 90,02% para o diluidor BTS e de 87,30% para o Androhep, com média de leitões nascidos totais de 11,80 leitões, para ambos diluidores.

Uma questão a ser discutida no presente experimento, envolve as diferenças de motilidade espermática encontradas nos diferentes tratamentos, e a sua relação com a fertilidade. Observa-se nas tabelas 30, 31, 32 e 33 que os menores valores de motilidade estiveram associadas à fração 1 do ejaculado, principalmente no tratamento em que essa fração foi diluída no diluidor MR-A (F1T1). Entretanto, nas tabelas 41 e 42 observa-se que a taxa de parto e as características de leitegada não diferiram ( $p>0,05$ ) entre as frações. Com isso, não se observou no presente experimento, relação entre motilidade espermática e os resultados de fertilidade. Entretanto, Rodriguez-

Martínez et al. (2005) citam que os padrões de motilidade encontrados na fração 1 após a coleta, quando resfriada à 15°C, resfriado à 5°C e 30 minutos após o descongelamento, foram sempre superiores aos encontrados para a fração 2. Esses achados não estão de acordo com os encontrados no presente experimento, sendo os valores de motilidade superiores ( $p<0,05$ ) na fração 2 do ejaculado, após a estocagem do sêmen (tabelas 30, 31, 32 e 33). Apesar disso, os dados aqui demonstrados, confirmam a habilidade fecundante dos espermatozóides oriundos da fração 1 do ejaculado. Vários estudos na espécie suína têm sugerido que os espermatozóides oriundos dessa fração são aqueles que melhor sobrevivem à manipulação, incluindo a criopreservação (Sellés *et al.*, 2001; Peña *et al.*, 2003; Peña *et al.*, 2004a). Como mencionado anteriormente, possivelmente a constituição do plasma seminal de porções específicas do ejaculado, exerçam um efeito positivo sobre os espermatozóides, especialmente os perfis protéicos presentes nessas frações.

De acordo com Töpfer-Petersen e Calvete (1996) e Jansen et al. (2001) os espermatozóides apresentam uma cobertura de proteínas (espermadinas) sobre suas membranas, as quais tem a função de prevenir reações acrossômicas prematuras, sendo a mesma liberada após a capacitação. Assim, essas espermadinas estariam envolvidas na regulação da capacitação, apresentando dupla função, já que manteriam as células espermáticas estáveis até sua chegada à tuba uterina, onde promoveriam sua capacitação. Nesse sentido, Caballero et al. (2006) demonstraram que o heterodímero PSP-I/PSP-II se une à membrana dos espermatozóides antes ou durante a ejaculação, e que essa união é suficientemente forte para que a proteína permaneça unida por várias horas em uma grande percentagem de espermatozóides,

inclusive submetidos a grande diluições, como foi o caso da fração 1 do ejaculado, no presente experimento, submetida à diluições muito acima das recomendadas pela literatura.

De acordo com Manásková e Jonáková (2008), as espermadesinas da família PSP, podem ser encontradas na superfície dos espermatozóides presentes tanto no epidídimo quanto no ejaculado. A presença das espermadesinas PSP na superfície dos espermatozóides encontrados no epidídimo, confirma que essas proteínas estão contidas no fluido epididimário, e possuem habilidade de se unir aos espermatozóides durante a maturação nesse local. Entretanto, Garcia et al. (2009) demonstraram que a presença do heterodímero PSP-I/PSP-II na fração rica do ejaculado é baixa, mas que, apesar da grande quantidade do heterodímero encontrado na fração pós-espermática, o efeito do plasma seminal dessa fração sobre os espermatozóides altamente diluídos não foram tão benéficos quanto o produzido pelo plasma da fração rica. Contudo, de acordo com os mesmos autores, o efeito negativo que exerce o plasma seminal da fração pós-espermática também poderia ser devido, à presença das proteínas HBPs, já que sua concentração aumenta de forma paralela à do heterodímero PSP-I/PSP-II na fração pós-espermática. Esses resultados são similares aos apresentados por Centurión et al. (2003), quando observou-se que ao se incubar os espermatozóides do varrão, altamente diluídos, na presença de todas as espermadesinas (PSPs e HBPs), houve uma redução da funcionalidade espermática devido a presença das HBPs. Dessa forma, considerando-se que a fração 2 do presente experimento, era constituída do restante da fração rica e da fração pós-espermática, hipotetiza-se que a grande concentração de HBPs nessa fração poderia em tese, prejudicar o potencial fecundante dos espermatozóides oriundos dessa fração, embora, os resultados de fertilidade

apresentados pelas frações 1 e 2 tenham sido similares ( $p > 0,05$ ).

Com relação ao potencial de fertilidade das sub-populações de espermatozóides presentes nas frações, Rodriguez-Martinez et al. (2005) sugerem que os oriundos da primeira porção da fração rica (primeiros 10 mL), devem ser considerados, dentre toda a população de espermatozóides do ejaculado, como aqueles que primariamente colonizarão o reservatório espermático na tuba uterina das porcas, e portanto, aqueles que principalmente e potencialmente estarão envolvidos na fertilização. Sendo assim, considerando-se a menor concentração do heterodímero PSP-I/PSP-II na primeira porção da fração rica do ejaculado (primeiros 10 a 15 mL), em comparação ao restante da fração rica e fração pós-espermática, há indícios de que os espermatozóides oriundos dessa fração possam atingir o reservatório espermático, sem risco de serem fagocitados, considerando-se o efeito das espermadesinas no desencadeamento da migração de PMN para o lúmen uterino.

De acordo com Novak et al. (2009), a diferença no perfil protéico entre as frações do ejaculado, estaria ligada à concentração espermática. Sendo assim, a menor concentração de proteínas encontrada no plasma seminal da fração rica, e especialmente na primeira porção da fração rica, em comparação ao que se observa na fração pós-espermática, seria devido à maior concentração espermática presente nessa fração. Pode ser que o grande número de espermatozóides nela presentes, reteria uma grande proporção de proteínas ligadas às suas membranas, de forma a reduzir a sua quantidade residual presente no plasma seminal daquela fração.

Os altos índices de fertilidade e das características de leitegada encontrados no presente experimento para a fração 1, poderiam ser explicados baseando-se nas

afirmativas de Novak et al. (2009), as quais confirmam que os espermatozoides oriundos da primeira porção da fração rica do ejaculado, exibem efeito positivo na fertilização, demonstrado *in vitro*. Os mesmos autores sugerem que as altas concentrações de certas proteínas, especialmente de espermadesinas, tem um efeito negativo sobre a fertilidade *in vivo*. Assim, embora as proteínas devam ter um importante papel na longevidade espermática, como fatores decapacitantes, podem também reduzir a fertilidade, se em excesso, ou se os espermatozoides forem expostos a elas por períodos prolongados de tempo.

E embora os perfis de proteínas do plasma seminal têm sido muito estudadas, o conteúdo de íons, tais como o cálcio e bicarbonato, que demonstram grande importância para a função espermática, devem contribuir para as diferentes características espermáticas dentre as frações do ejaculado (Saravia, 2008). Para Saravia et al. (2010), além da menor quantidade de proteínas do plasma seminal de origem das glândulas acessórias e da presença de proteínas do plasma epididimário, o menor conteúdo de bicarbonato presente na primeira porção da fração rica do ejaculado, são os responsáveis pela maior resistência das células espermáticas oriundas dessa fração. O bicarbonato tem um importante papel na função espermática, tal como desencadear a motilidade dos espermatozoides, oriundos do epidídimo (Rodriguez-Martinez et al., 1991), através da ativação direta da adenilciclase dos espermatozoides, além de ser a molécula que inicia o rearranjo lipídico na membrana plasmática dos espermatozoides, considerado um dos eventos iniciais da capacitação espermática (Gadella e Van Gestel, 2004; Tienthai et al., 2004). Além disso, a concentração de bicarbonato também varia ao longo da tuba uterina.

Diante disso, Saravia et al. (2010) sugerem que as baixas concentrações de bicarbonato, presentes em pontos específicos (reservatório espermático do macho e da fêmea), são parte da estratégia para preservar os espermatozoides intactos, até o momento da cobertura/ejaculação ou ovulação. Confirmando essa hipótese, Saravia et al. (2007) relatam que a menor concentração de bicarbonato na fração 1 (primeira porção da fração rica) do ejaculado possibilitou uma melhor sobrevivência espermática, das células oriundas dessa fração, durante o congelamento/descongelamento, quando comparou-se ao desempenho do restante do ejaculado. Dessa forma, acredita-se que mesmo diante da menor motilidade apresentada pelos espermatozoides oriundos da fração 1 do ejaculado no presente experimento, essa fração foi capaz de manter uma adequada capacidade fecundante. Especula-se que a presença de proteínas, especialmente das espermadesinas, formando uma cobertura sobre os espermatozoides dessa fração, os protegeria até o momento da fecundação. Não é demais salientar também, a menor concentração de bicarbonato presente nessa fração, capaz de manter a integridade das membranas espermáticas, já que o processo de capacitação não deve ser iniciado prematuramente. Finalmente, não deveria ser descartado um efeito aditivo das duas situações, resultando na manutenção da habilidade fecundante das células espermáticas dessa fração do ejaculado.

Os dados relativos ao número de leitões natimortos e mumificados encontrados no presente experimento (tabela 41), estão dentro do esperado e considerado normal pela literatura. De acordo com Van der Lende (2000), as perdas fetais (mumificados e natimortos) podem variar de 5 a 15%. Vários fatores estão associados com a presença de natimortos, como doenças infecciosas, duração da gestação,

ordem de parto, tamanho da leitegada, duração do parto, intervalo entre nascimento dos leitões, peso dos leitões, distocia, estresse em consequência das altas temperaturas, interferência humana na assistência ao parto, condição corporal e deficiência nutricional (Leenhouders et al., 1999; Tantasuparuk et al., 2000; Lucia Jr. et al., 2002; Schneider, 2002). A mumificação fetal tem sido associada à doenças infecciosas, ordem de parto, tamanho da leitegada, capacidade uterina, temperatura ambiental e micotoxinas (Dial et al., 1992; Mengeling et al., 2000; Schneider et al., 2003).

A ocorrência de leitões natimortos em geral está associada à anoxia fetal, pelo rompimento do cordão umbilical, o que é bastante comum em partos distócitos. A natimortalidade é a principal causa de mortalidade de leitões, sendo significativamente relacionada ao número de leitões desmamados/fêmea/ano (Dial et al. 1992).

Considera-se que quando a morte ocorre no período fetal, a partir de 35 dias de gestação, o esqueleto já esteja calcificado, não sendo, portanto, reabsorvido. Desta forma, os fetos que morrem e não são reabsorvidos e nem sofrem contaminação bacteriana ficam mumificados (Dial et al., 1992). A mumificação indica morte fetal após a ossificação com reabsorção dos líquidos dos tecidos moles (Sims e Glastonbury, 1996, citado por Borges et al., 2005). Os fetos mumificados apresentam elevado grau de desidratação e escurecem, apresentando coloração variando de cinza escuro, marrom escuro, ou quase preta; eles são expulsos junto com os outros leitões, durante o parto, com a placenta correspondente, a qual se apresenta, também, desidratada (Dial et al., 1992).

O índice aceitável de leitões natimortos está entre 3 e 5% (Muirhead e Alexander, 1997), não devendo ultrapassar 7% (Dial et

al., 1992), embora taxas que variam de 3 a 10% tenham sido relatadas (Cutler et al., 1992; Van Der Lende et al., 2001).

Uma prevalência de 0,5% de mumificação é considerada comum, sendo o índice de 1,5% considerado como o máximo aceitável (Dial et al., 1992). Entretanto, Borges et al. (2003) registraram variação de 3,6 a 5,6% de mumificados quando de um acompanhamento de mais de 500 partos, em quatro granjas brasileiras de suínos. Em um estudo europeu, no qual foram acompanhados 192 partos de leitões, observou-se uma taxa de mumificados de 6,8% (Van der Lende e Van Rens, 2003).

Avaliando seis granjas comerciais no Brasil, Schneider (2002) relatou valores de mumificação fetal variando de 1,9 a 5,7%. Borges et al. (2005) observaram uma ocorrência de 5,6% de leitões natimortos e 3,4% de mumificados.

Borges et al. (2008) acompanhando o nascimento de 7061 leitões de 575 partos, observaram a ocorrência de 6,0% e 3,8% de leitões natimortos e mumificados, respectivamente.

A preocupação com o percentual de fetos mumificados tem aumentado nos últimos tempos, podendo estar associada ao aumento do tamanho das leitegadas observado nos últimos anos e/ou uma maior precisão nos dados envolvendo fetos mumificados (Borges et al., 2008).

Em linhas gerais, pretendeu-se com esse experimento, desenvolver um protocolo que facilitasse o processamento do sêmen, e transporte do mesmo a partir da central de inseminação, para granjas localizadas a diferentes distâncias, inclusive para àquelas que necessitam de transporte aéreo. Sabe-se que uma das grandes limitações no transporte do sêmen suíno, é o grande volume presente em cada dose inseminante, necessário para realizar cada inseminação artificial, considerando-se ainda a

necessidade de duas a três inseminações por ciclo de cada fêmea. Diante desse desafio, várias alternativas têm sido utilizadas na rotina para o transporte do sêmen, sendo utilizadas principalmente caixas isotérmicas (isopor), sem fonte refrigeradora homogênea para as doses inseminantes, ou unidades refrigeradoras industrializadas, que embora possibilitem a manutenção constante e uniforme da temperatura, são muitas vezes grandes e pouco práticas para o transporte, além de necessitarem de uma fonte de energia elétrica; assim, são mais indicadas para o uso em laboratório. Sendo assim, vários trabalhos foram desenvolvidos nos últimos anos, visando desenvolver novos protocolos de resfriamento e transporte do sêmen de varrões de forma prática e eficiente. O contêiner proposto por Roner et al. (2006) mostrou-se eficiente para a manutenção da temperatura das doses inseminantes a 5 ou 17°C, com curvas de resfriamentos ideais, e apresentando características muito importantes do ponto de vista do transporte, pois é barato, pequeno, leve e, possivelmente descartável, requisitos básicos, principalmente em se tratando de transporte aéreo. Contudo, a grande limitação desse contêiner, é possibilitar o transporte de apenas 12 doses inseminantes de cada vez, uma capacidade medíocre do ponto de vista da verticalização da suinocultura nacional, tornando-o insatisfatório, do ponto de vista de utilização comercial.

Através do protocolo desenvolvido no presente trabalho, manipulando a primeira porção da fração rica do ejaculado, que apresenta grande concentração espermática em um pequeno volume, grandes possibilidades poderão se concretizar. Os dados apresentados aqui, demonstraram que os espermatozoides presentes na fração 1 do ejaculado são eficientes para o processo de fertilização, e que embora apresentassem padrões de motilidade inferiores aos da

fração 2, apresentaram taxas de gestação e características de leitegadas similares às da fração 2 (tabela 42), inclusive, numericamente superiores, embora os resultados não tenham diferido.

Diante dos dados apresentados anteriormente, associados aos das tabelas 13, 26 e 44, verifica-se que a fração 1 apresentou uma média de  $16,89 \times 10^9$  de espermatozói-de móveis totais. Isso significa a produção de 5,63 doses inseminantes, considerando-se a concentração de  $3 \times 10^9$  de espermatozói-de móveis/dose inseminante, normalmente utilizada na indústria da inseminação artificial. No presente experimento, imediatamente após a coleta, essa fração sofria uma pré-diluição na proporção de 1:3 (sêmen:diluidor), com posterior diluição e preparação das doses inseminantes após o cálculo da concentração. Entretanto, a partir do conhecimento adquirido aqui, associado aos resultados de outros experimentos contemporâneos, outras alternativas se mostram promissoras.

Vale ressaltar, que como os resultados da fração 2 não foram inferiores (tabela 42), recomenda-se a sua utilização, ou seja, do restante do ejaculado, após a coleta da fração 1, para a preparação de doses inseminantes a serem utilizadas na própria granja, não sendo necessário o descarte dessa fração, já que o número médio de espermatozói-des móveis presente na mesma (tabela 44), possibilitou a produção de cerca de 10 doses inseminantes por cada ejaculado. Nesse sentido, Saravia (2008) propôs a utilização da fração 1 para o congelamento do sêmen e da fração 2 para as inseminações rotineiras a serem realizadas nas granjas.

#### **4.3 Características físicas do sêmen e desempenho reprodutivo dos varrões dos Experimentos I e II**

Considerando-se a escassez de dados na literatura envolvendo as características dos primeiros 15 mL da fração rica do ejaculado, aqui denominada de fração 1, pretendeu-se nesse capítulo apenas compilar os dados dos ejaculados coletados nos dois experimentos, a fim de aumentar o

número de amostras e a confiabilidade dos dados.

Assim, a tabela 44 contém os dados das características físicas e do desempenho reprodutivo dos varrões, submetidos à 31 coletas fracionadas do sêmen.

Tabela 44. Características físicas do sêmen e desempenho reprodutivo dos varrões utilizados nos Experimentos I e II

Parâmetros avaliados	Fração do ejaculado	
	Fração 1 (15 mL)	Fração 2 (restante)
Número de varrões	05	05
Número de ejaculados	31	31
Volume do sêmen (mL)	15,00	199,12 ± 0,01
Motilidade do sêmen a fresco (%)	73,87 ± 0,86	74,35 ± 0,76
Vigor do sêmen a fresco (0 – 5)	4,50 ± 0,08	4,39 ± 0,07
Nº de spz/mL (x10 <sup>6</sup> )	1503,87 ± 121,62 <sup>a</sup>	220,32 ± 18,26 <sup>b</sup>
Nº de spz móveis/mL (x10 <sup>6</sup> )	1126,65 ± 95,35 <sup>a</sup>	163,99 ± 13,96 <sup>b</sup>
Nº de spz totais/fração (x10 <sup>9</sup> )	22,56 ± 1,82 <sup>b</sup>	41,36 ± 3,06 <sup>a</sup>
Nº de spz móveis/fração(x10 <sup>9</sup> )	16,89 ± 1,43 <sup>b</sup>	30,76 ± 2,34 <sup>a</sup>
Volume de sêmen/dose inseminante (mL)	3,82 ± 0,54 <sup>b</sup>	22,69 ± 2,11 <sup>a</sup>
Volume de diluidor/dose inseminante (mL)	96,18 ± 0,54 <sup>a</sup>	77,31 ± 2,11 <sup>b</sup>
Nº potencial de fêmeas inseminadas	5,63 ± 0,48 <sup>b</sup>	10,25 ± 0,78 <sup>a</sup>
Tempo da colheita à pré-diluição (min)	4,23 ± 0,14	-
Tempo da colheita à diluição (min)	17,39 ± 0,63 <sup>b</sup>	20,61 ± 0,98 <sup>a</sup>
Tempo da colheita ao resfriamento (min)	56,10 ± 4,23	48,93 ± 4,35

<sup>a,b</sup> Médias seguidas de letras diferentes, na mesma linha, diferem (p < 0,05)

As análises estatísticas referentes à tabela 44, estão apresentadas no anexo III (páginas 215 a 217).

Na tabela 45 observa-se as características de cor e aspecto do sêmen de acordo com a fração do ejaculado, após 31 coletas de sêmen.

Tabela 45. Influência da fração do ejaculado sobre a cor/aspecto do sêmen *in natura* nos Experimentos I e II

Fração do ejaculado	Cor/aspecto do sêmen		
	Leitoso (%)	Soroso-leitoso(%)	Soroso (%)
1	87,10 (27/31)	12,90 (4/31)	0,00
2	32,26 (10/31)	54,84 (17/31)	12,90 (4/31)

Finalmente, na tabela 46 está apresentado o número de aglutinações presentes no sêmen

*in natura* de acordo com a fração do ejaculado, após 31 coletas de sêmen.

Tabela 46. Número de aglutinações no sêmen *in natura* de acordo com a fração do ejaculado, nos Experimentos I e II

Fração do ejaculado	Número de aglutinações		
	1 a 2	3 a 5	≥ 6
1	70,97 (22/31)	25,81 (8/31)	3,23 (1/31)
2	61,29 (19/31)	35,48 (11/31)	3,23 (1/31)

## 5. CONCLUSÕES

- A coleta fracionada do sêmen pode ser realizada de maneira simples e eficiente, não apresentando maiores complicações durante sua execução;
- A fração 1 do ejaculado (primeiros 15 mL da fração rica) apresentou uma concentração correspondente a cerca de 35% do número total de espermatozóides do ejaculado;
- As doses inseminantes diluídas no diluidor glicina-gema de ovo apresentaram as melhores características de motilidade e vigor espermáticos, quando comparadas às diluídas no diluidor MR-A;
- Não houve diferenças quanto às percentagens de espermatozóides normais entre as duas frações do ejaculado a fresco; contudo, a fração 1 apresentou maior percentagem de gotas citoplasmáticas distais nos espermatozóides ejaculados que a fração 2;
- A morfologia espermática manteve-se dentro de limites aceitáveis em todos os tratamentos, ao longo da estocagem;
- O método de resfriamento do sêmen utilizando o diluidor glicina-gema de ovo associado à temperatura de 5°C, proporcionou maiores percentagens de acrossomas lesados que o envolvendo o diluidor MR-A a 17°C;
- Não se observaram diferenças no que diz respeito às taxas de gestação e de parto, e das

características de leitegada entre as duas frações do ejaculado;

- Doses inseminantes oriundas das frações 1 e 2 do ejaculado mantiveram a fertilidade e prolificidade por período de aproximadamente 24 horas de estocagem;
- Não houve diferenças entre os protocolos de resfriamento do sêmen sobre as taxas de gestação e de parto, contudo, o protocolo associado ao resfriamento do sêmen à 5°C, utilizando o diluidor glicina-gema de ovo, apresentou uma média de leitões nascidos vivos inferior ao observado no protocolo de resfriamento à 17°C, incluindo o diluidor MR-A;
- Finalmente, a utilização da Fração 1, através da coleta fracionada do ejaculado, possibilitará o surgimento de novas propostas, no que diz respeito ao transporte do sêmen suíno, enquanto a Fração 2 do ejaculado mostrou-se eficiente, para utilização dentro da própria granja;

## 6. PROPOSTAS FUTURAS

- Realizar a inseminação artificial com o sêmen diluído e resfriado, armazenado por maiores períodos de tempos em relação aos testados no presente experimento;
- Transportar o sêmen resfriado para diferentes granjas e avaliar o seu comportamento, quanto às taxas de concepção;

- Avaliar as alterações morfológicas e de membrana espermática após o resfriamento, diante das mesmas condições de estocagem realizadas nesse experimento;
- Transportar doses inseminantes oriundas da fração 1, de maneira super-concentrada, de forma a otimizar o contêiner utilizado no presente experimento;
- Determinar qual o número máximo de células espermáticas por mL do sêmen diluído a ser transportado, antes da rediluição para a preparação das doses inseminantes a serem utilizadas;
- Determinar o período máximo de estocagem do sêmen super-concentrado, sem que haja redução em sua capacidade fecundante;
- Testar a inseminação intrauterina e intrauterina profunda utilizando doses oriundas da fração 1 do ejaculado, de forma a otimizar a sua utilização;

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AALBERS, J.G.; RADEAMAKER, J.H.M.; GROTEN, H.J.G. Fecundity of boar semen stored in BTS, Kiev, Zorlesco and Modena extenders under field conditions. *J Anim Sci.*, suppl. 1, v.57, p.314-315, 1983.
- AKCAY, E.; REILAS, T.; ANDERSON, M. et al. Effect of seminal plasma fractions on stallion sperm survival after cooled storage. *J. Vet. Med.*, v.53, p.481-485, 2006.
- ALEXOPOULOS, C.; BOSCO, C.; SARATSIS, PH. et al. The effect of storage time and number of spermatozoa per insemination dose on semen characteristics and fertilizing capacity of boar semen diluted with Beltsville Thaw Solution (BTS) extender. *Anim. Sci.*, v.62, p.599-604, 1996.
- ALM, K.; PELTONIEMI, O.; KOSKINEN, E. et al. Porcine field fertility with two different insemination doses and the effect of sperm morphology. *Reprod Dom Anim.*, v.41, p.210-213, 2006.
- ALMEIDA, F.R.C.L., NOVAK, S., FOXCROFT, G.R. The time of ovulation in relation to estrus duration in gilts. *Theriogenology*, v.53, p.1389-1396, 2000.
- ALMOND, G.W.; BRITT, J.H.; CARR, J. et al. *The swine AI Book*. A field and laboratory technician's guide to artificial insemination in swine. Raleigh, NC: Mini Tube of America, 2ed, 1994. 108p.
- ALMOND, G.W. Investigation into sow infertility. *The Pig Journal*, v.35, p.20-27, 1995.
- ALMOND, G.J.; BRITT, B.; FLOWERS, C. et al. *The SWINE AI Book: A field and laboratory technicians' guide to artificial insemination in swine* 2.ed. Raleigh, NC; Southern Cross Publishing, 1998.
- ALTHOUSE, G. Optimizing productivity of the Ai boar. In: NORTH CAROLINA HEALTH HOGS SEMINAR, 1997, North Carolina. Proc... North Carolina: 1997.
- ALTHOUSE, G.C.; WILSON, M.E.; JUSTER, C. et al. Characterization of lower temperature storage limitations of fresh-extender porcine semen. *Theriogenology*, v.50, p.535-543, 1998.

- ALTHOUSE, G.C.; KUSTER, C.E.; CLARCK, S.G. et al. Field investigations of bacterial contaminants and their effects on extended porcine semen. *Theriogenology*, v. 53, p. 1167-1176, 2000.
- ALTHOUSE, G.C.; LU, K.G. Bacteriospermia in extended porcine semen. *Theriogenology*, v. 63, p. 573-584, 2005.
- ALVAREZ, J.G.; STOREY, B.T. Spontaneous lipid peroxidation in rabbit epididymal spermatozoa: its effect on sperm motility. *Biol Reprod.*, v.27, p.1102-1108, 1982.
- AMIRAT, L.; TAINURIER, D.; JEANNEAU, L. et al. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: A comparison with Optidyl, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology*, v.61, p.895-907, 2004.
- ARIENTI, G.; CARLINI, E.; PALMERINI, C.A. Fusion of human sperm to prostasomes at acidic pH. *J Membr Biol.*, v.155, p.89-94, 1997.
- ASHWORTH, P.J.C.; HARRISON, R.A.P.; MILLER, N.G. Survival of ram spermatozoa at high dilution: protective effect of simple constituents of culture media as compared with seminal plasma. *Reprod Fertil Develop.*, v.6, p.173-180, 1994.
- ASSREUY, A.M.S.; ALENCAR, N.M.N.; CAVADA, B.S. et al. Porcine spermadhesin PSP-I/PSP-II stimulates macrophages to release a neutrophil chemotactic substance: modulation by mast cells. *Biol. Reprod.*, v.68, p.1836-1841, 2003.
- BAMBA, K.; CRAN, D.G. Effect of rapid warming of boar semen on sperm morphology and physiology. *J. Reprod. Fert.*, v.75, p. 133-138, 1985.
- BAMBA K.; CRAN, D.G. Effects of treatment with butylated hydroxytoluene on the susceptibility of boar spermatozoa to cold stress and dilution. *J. Reprod. Fert.*, v.95, p.69-77,1992.
- BARB, C.R.; KRAELING, R.R.; RAMPACEK, G.B. Opioid modulation of gonadotropin and prolactin secretion in domestic farm animals. *Dom. Anim. Endocrinol.*, v.8, p.15-27, 1991.
- BARRIOS, B.; PÉREZ-PÉ, R.; GALLEGO, M. et al. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biol. Reprod.*, v.63, p.1531-1537, 2000.
- BARTH, A.D; OKO, R.J. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Ames, IA: Iowa State University Press, 1989.
- BATHGATE, R.; ERIKSSON, B.M.; THOMPSON, P.C. et al. Field fertility of frozen-thawed boar sperm at low doses using non-surgical, deep uterine insemination. *Anim. Reprod. Sci.*, v.103, p.323-335, 2008.
- BELSTRA, B.A. Investigations of pospartum and postweaning factors that may affect subsequent sow reproductive performance. 2004. 207f. (Doctor of Philosophy, Animal Science) North Carolina State University, Raleigh.
- BENNEMANN, P.E.; MILBRADT, E.; DIEHL, G.N. et al.. Reproductive performance of sows submitted to intrauterine insemination at different pre-ovulatory intervals. *Anim. Reprod.*, v.1, p.106-110, 2004.
- BENNEMANN P.E., DIEHL G.N., MILBRADT E., et al. Artificial

- Insemination of gilts with 1,5 billion sperms stored in different periods associated with different pre-ovulatory intervals. *Reprod. Dom. Anim.*, v.40, p.507-510, 2005.
- BERGER, T., ANDERSON, D.L., AND PENEDO, M.C.T. Porcine sperm fertilizing potential in relationship to sperm functional capacities. *Anim. Reprod. Sci.*, v.44, p.231-239, 1996.
- BERGERON, A.; MANJUNATH, P. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Molecular Reproduction and Development*, v.73, p.1338-1344, 2006.
- BLICHFELDT, T.; ALMID, T.; STAVNE, S.E. Liquid preservation of boar semen in Kiev or BTS. A field comparison. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 11. Dublin, 1988, Anais... Dublin:1988. v. 3.p.231.
- BLOM, E. Sygelige tilstande i konsorganer og sperma som kassationsårsag ved import og eksport af avlstyre til og fra Danmark [Pathological conditions in the genital organs and in the semen as ground for rejection of breeding bulls for import or export to and from Denmark]. *Nord. Vet.*, v.35, p.105-130, 1983.
- BONET, S.; BRIZ, M.; PINART, E. Light microscopy characterization of sperm morphology. *Mic. Anal.*, v.9, p.29-31, 1995.
- BORGES, V.F.; WEBER, D.; SOUZA, L.P. et al. Importância da mumificação fetal na suinocultura moderna. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 11, 2003, Goiânia, Anais...Goiânia: 2003, p.195-196.
- BORGES, V.F.; BERNARDI, M.L.; BORTOLOZZO, F.P. et al. Risk factors for stillbirth and foetal mummification in four Brazilian swine herds. *Prev. Vet. Med.*, v.70, p.165-176, 2005.
- BORGES, V.F.; BERNARDI, M.L.; BORTOLOZZO, F.P. et al. Perfil de natimortalidade de acordo com a ordem de nascimento, peso e sexo dos leitões. *Arg. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.60, n.5, p.1234-1240, 2008.
- BORTOLOZZO F.P., WENTZ I., FERREIRA F.M., et al. Exame do ejaculado. In: BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I. (Eds). *Suinocultura em ação: Inseminação artificial na suinocultura tecnificada*. Porto Alegre: Pallotti, 2005a. Volume 2, p.69-90.
- BORTOLOZZO, F. P.; UEMOTO, D.P.; BENNEMANN, P.E. et al. Influence of time of insemination relative to ovulation and frequency of insemination on gilt fertility. *Theriogenology*, v.64, p.1956-1962, 2005b.
- BOWER, R. E. JR.; CRABO, B. G.; GRAHAM E. F. Factors affecting myometrial activity in pigs. *J. Anim. Sci.*, v.39, p.200, 1974.
- BRAGA, C.S.R. *Fertilidade de fêmeas suínas inseminadas com sêmen diluído e resfriado a 5°C ou 17°C*. 2007. 173p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte.
- BRAGA, C.S.R.; PALHARES, M.S.; SIQUEIRA, A.P. et al. Fertilidade de fêmeas suínas inseminadas com sêmen diluído em dois diferentes diluidores e resfriado a 17°C em geladeira ou a 5°C, em contêiner especial. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS

- (ABRAVES), 14, 2009, Uberlândia. *Anais...* Belo Horizonte, 2009a.
- BRAGA, C.S.R.; PALHARES, M.S.; SIQUEIRA, A.P. et al. Efeito do número de inseminações sobre a fertilidade de fêmeas suínas inseminadas com sêmen diluído e resfriado a 5°C ou 17°C. IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS (ABRAVES), 14, 2009, Uberlândia, *Anais...* Belo Horizonte, 2009b.
- BRACKEN, C.J., SAFRANSKI, T.J.; CANTLEY, T.C. et al. Effect of time of ovulation and sperm concentration on fertilization rate in gilts. *Theriogenology*, v.60, p.669–676, 2003.
- BRITT, J.H.; ARMSTRONG, J.D.; COX, N.M.; et al. Control of follicular development during and after lactation in sows. *J. Reprod. Fertil.*, suppl., v.33, p.37-54, 1985.
- BRITT, J.H.; ALMOND, G.W.; FLOWERS, W.L. Diseases of the reproductive system. In: Straw B, D'Allaire S, Mengeling W, Taylor D (eds), *Diseases of Swine*, 8th edn. Blackwell Science Ltd: Oxford, 1999, p. 903.
- BRIZ, M.D. *Anàlisi microscòpica de l'esperma ejaculada i de la maduració epididimària dels espermatozoides de Sus domesticus*. 1994.59p. Thesis (Doctoral in Veterinary Science), University of Girona, Spain.
- BURGER, J.P. Sex physiology of pigs. *J. Vet. Res.*, v.2, p.1-128, 1952.
- CABALLERO, I.; VAZQUEZ, J.M.; CENTURION, F. et al. Comparative effects of autologous and homologous seminal plasma on the viability of largely extended boar spermatozoa. *Reprod. Domest. Anim.*, v.39, p.370-375, 2004.
- CABALLERO, I.; VAZQUEZ, J.M.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. et al. Influence of seminal plasma PSP-I/PSP-II spermadhesin on pig gamete interaction. *Zigote*, v.13, p.11-16, 2005.
- CABALLERO, I.; VÁZQUEZ, J.M.; GARCIA, E.M. et al. Immunolocalization and possible functional role of PSP-I/PSP-II heterodimer in highly extended boar spermatozoa. *J. Androl.*, v.27, p.766-773, 2006.
- CALVETE, J.J.; MANN, K.; SCHAFFER, W. et al. Boar spermadhesin PSP-II: localization of postranslational modifications, heterodimer formation with PSP-I glycoforms and effect of dimerization on the ligand-binding capabilities of the subunits. *FEBS Lett*, v.365, 179-182, 1995.
- CALVETE, J.J.; DOSTÁLOVÁ, Z.; SANZ, L. et al. Mapping the heparin-binding domain of boar spermadhesins. *FEBS Lett*, v.379, p.207-211, 1996a.
- CALVETE, J.J.; SANZ, L.; ENBLIN, M. et al. Sperm surface proteins. In: Rath D, Johnson LA and Weitze KF (eds), *Boar Semen Preservation III. Reprod Dom Anim.*, v.31, p.101-105, 1996b.
- CALVETE, J.J.; SANZ, L. Insights into structure-function correlations of ungulate seminal plasma proteins. *Soc. Reprod. Fertil. suppl.*, v.65, p.201-215, 2007.
- CALVIN, J.; TUBBS, P.K. Mitochondrial transport processes and oxidation of NADH by hypotonically –treated boar spermatozoa. *Eur. J. Biochem.*, v.89, p.315–320, 1978.
- CARDOZO, J.A.; FERNÁNDEZ-JUAN, M.; FORCADA, F. et al. Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analysed by twodimensional polyacrilamide

gel electrophoresis. *Theriogenology*, v.66, p.841-850, 2006.

CASTAGNA, C.D.; PEIXOTO, C.H.; BORTOLOZZO, F.P. et al. Desempenho reprodutivo e intervalo entre a inseminação e o momento da ovulação, de acordo com a estratégia de inseminação artificial utilizada. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS. 10, 2001, Porto Alegre, Anais..., Porto Alegre:2001, p.265-266

CATT, S.L.; O'BRIEN, J.K.; MAXWELL, W.M.C.; et al. Assessment of ram and boar spermatozoa during cell-sorting by flow cytometry. *Reprod. Dom. Anim.*, v.32, p.251-258, 1997.

CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 2. Ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998, 49p.

CENTURIÓN, F.; VÁZQUEZ, J.M.; CALVETE, J.J. et al. Influence of porcine spermadhesins on the susceptibility of boar spermatozoa to high dilution. *Biol. Reprod.*, v.69, p.640-646, 2003.

CEROLINI, S.; MALDJIAN, A.; GLIOZZI, T.; PIZZI, F. et al. Relationship between lipid composition and viability of boar spermatozoa after freezing/thawing. IN: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BOAR SEMEN PRESERVATION, 4, 1999, Beltsville, Proc... Beltsville: 2000, p.240.

CHANG, M.C. A detrimental effect of seminal plasma on the fertilizing capacity of sperm. *Nature*, v.179, p.258-259, 1957.

CHANTLER, E.; ABRAHAM-PESKIR, J.V. Significance of midpiece vesicles and functional integrity of the membranes of human spermatozoa after osmotic stress. *Andrologia*, v.36, p.87-93, 2004.

CHARBONNEL, B., KREMER, M., GEROZISSIS, K. Human cervical mucus contains large amounts of prostaglandins. *Fert. Ster.*, v.38, p.109-111, 1982.

CHENG, H.; ALTHOUSE, G.C.; HSU, W.H. Prostaglandin F 2 $\alpha$  added to extended boar semen at processing elicits in vitro myometrial contractility after 72 hours of storage. *Theriogenology*, v.55, p.1901-1906, 2001.

CHRISTENSEN, P.; KNUDSEN, D.B.; WACHMANN, H. et al. Quality control in boar semen production and correlation to field fertility. *Theriogenology*, v.62, p.1218-1228, 2004.

CHRISTOVA, Y.; JAMES, P.S.; COOPER, T.G. et al. Lipid diffusion in the plasma membrane of mouse spermatozoa: changes during epididymal maturation, effects of pH, osmotic pressure and knockout of the c-ros gene. *J. And.*; v.23, p.384-392, 2002.

CLAUS, R. Physiological role of seminal components in the reproductive tract of the female pig. *J. Reprod Fertil.*, suppl, v.40, p.117-131, 1990.

CLAUS, R.; SCHAMS, D. Influence of mating and intra-uterine estradiol infusion on peripheral oxytocin concentrations in the sow. *J. Endocrinol.*, v.126, p.361-365, 1990.

COLENBRANDER, B.; FEITSMA, H.; GROOTEN, H.J. Optimizing semen production for artificial insemination in swine. *J. Reprod Fertil Suppl.*, v.48, p.207-15, 1993.

COLENBRANDER, B.; GADELLA, B.M.; STOUT, T.A.E. The predictive value of semen analysis in the evaluation of stallion fertility. *Reproduction in Domestic Animals*, v.38, p.305-311, 2003.

- COOPER, T.G.; YEUNG, C.H. Acquisition of volume regulatory response of sperm upon maturation in the epididymis and the role of the cytoplasmic droplet. *Microsc Res Tech.*, v.61, p.28–38, 2003.
- COOPER, T.G. Cytoplasmic droplets: the good, the bad or just confusing? *Human Reproduction*, v.20, p. 9–11, 2005.
- CÓRDOVA-IZQUIERDO, A., MUÑOZ-MENDOZA, R., CÓRDOVA-JIMÉNEZ, S. et al. Características del semen de verraco y su evaluación práctica. *Porcinocultura*, 2004.
- CORREA, M.N.; LUCIA JR, T.; AFONSO, J.A.B. et al. Reproductive performance of early-weaned female swine according to their estus profile and frequency of artificial insemination. *Theriogenology*, v.58, p.103-112, 2002.
- COSCONI, A.C.; REICHENBACH, H.D.; SCHWARTZ, J. et al. Sperm function and production of bovine embryos in vitro after swim-up with different calcium and caffeine concentration. *Anim. Reprod. Sci.*, v.61, p.59-67, 2001.
- COSTA, E.P.; AMARAL FILHA, W.S.; COSTA, A.H.A. Influence of the lactation length in the subsequent litter size of sows. *Anim. Reprod.*, v.1, n.1, p.111-114, 2004.
- COSTI, G. *Efeito de diluentes na qualidade de sêmen suíno armazenado a 17°C e no desempenho reprodutivo das fêmeas após a inseminação artificial*. 2003. 53f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Faculdade de Veterinária da UFRGS, Porto Alegre.
- COX, N.M.; BRITT, J.H. Relationships between endogenous gonadotropin-releasing hormone, gonadotropins, and follicular development after weaning in sows. *Biol. Reprod.*, v.27, p.70-78, 1982.
- COX, N.M.; BRITT, J.H.; ARMSTRONG, W.D. et al. Effect of feeding fat and altering weaning schedule on rebreeding in primiparous sows. *J. Anim. Sci.*, v.56, p.21-29, 1983.
- CRABO, B.G. Preservation of boar semen: a worldwide perspective. *Reprod. Dom. Anim.*, v.1, p.3-9, 1990.
- CRABO, B. G.; DIAL, G. D. Artificial insemination in swine. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, v.8, p.533–544, 1992.
- CUTLER, R.S.; FAHY, V.A.; SPICER, E.M. Prewaning mortality. In: LEMAN, A.D.; STRAW, B.E.; MENGELING, W.L.; D'ALLAIRE, S.; TAYLOR, D.J. (Eds). *Diseases of Swine*. 7ed. Ames: Iowa State University Press, 1992. p.847-860.
- CROWELL, S.R. Evaluating temperature effects and extension cooling rates on boar semen quality. 2009. 159p. Thesis ( Master of Science ) – Graduate Faculty of North Carolina State University.
- CURRY, M.R.; WATSON, P.F. Osmotic effects on ram and human sperm membranes in relation on thawing injury. *Cryobiology*, v.31, p.39-46, 1994.
- DACHEUX, J.L.; CASTELLA, S.; GATTI, J.L. et al.. Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. *Theriogenology*, v.63, p.319-341, 2005.
- DALIN, A.M., NANDA, T., HULTÉN, F. et al. Ovarian activity at naturally attained oestrus in the sow. An ultrasonographic and LH study. *Acta. Vet. Scand.*, v.36, p.377-382, 1995.

- DALLANORA, D.; MEZALIRA, A.; KATZER, L. H. et al. Desempenho reprodutivo de fêmeas suínas inseminadas pela técnica intra-uterina ou tradicional. *Pesq. Agropec. bras.*, vol.39, p.815-819, 2004.
- DAVIS, B.K.; NIWA, K. Decapacitation and recapacitation of rabbit spermatozoa treated with membrane vesicles from seminal plasma. *J. Reprod. Fertil.*, v.41, p.241-244, 1974.
- DAY, B.N.; MATHIAS, K.; DIDION, B.A. et al. Deep intrauterine insemination in sows: first field trial in a USA commercial farm with a newly development device. *Theriogenology*, v.59, p.213, 2003.
- DE AMBROGI, M.; BALLESTER, J.; SARAVIA, F. et al. Effect of storage in short- and long-term commercial semen extenders on the motility, plasma membrane and chromatin integrity of boar spermatozoa. *International Journal of Andrology*, v.29, p.543-552, 2006.
- DE LEEUW, F.; COLENBRANDER, B.; VERKLEIJ, A. The role membrane damage plays in cold shock and freezing injury. *Reprod. Dom. Anim.*, suppl., v.1, p.95-104, 1990.
- DE LEEUW, F.E.; DE LEEUW, A.M.; DEN DAAS, J.H. et al. Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology*, v.30, p.32-44, 1993.
- DE RENSIS, F.; HUNTER, M.G.; FOXCROFT, G.R.. Suckling-induced inhibition of luteinizing hormone secretion and follicular development in the early postpartum sow. *Biol. Reprod.*, v.48, p.964-969, 1993a.
- DESCHAMPS, J.C.; CORRÊA, M.N.; LUCIA, T. Jr. Impacto da inseminação artificial em suínos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 22, p. 75-79. 1998.
- DEWEY, C. E.; MARTIN, S.W.; FRIENDSHIP, R.M. et al. Associations between litter size and specific sow-level management factors in Ontario swine. *Prev. Vet. Med.*, v.23, p.101-110, 1995.
- DE WINTER, P.J.J.; VERDONCK, M.; DE KRUIF, A. et al. Endometritis and vaginal discharge in the sow. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 29, p.51-58, 1992.
- DIAL, G.D.; MARSH, W.E.; POLSON, D.D. et al. Reproductive failure: differential diagnosis. In: LEMAN, A.D.; STRAW, B.E.; MENGELING, W.L.; D'ALLAIRE, S.; TAYLOR, D.J. (Eds). *Diseases of Swine*, 7ed. Ames: Iowa State University Press, 1992. p.88-137.
- DIMITROV, S.; ATANASOV, V.; DICHLYANOVA, E.; et al. Comparison of three commercial diluents for short-term storage of boar sêmen. *Trakia Journal of Sciences*, v.7, n.1, p.58-62, 2009.
- DONADEU, M. Advances in male swine artificial insemination (AI) techniques. *The Pig Journal*, v.54, p.110-122, 2004.
- DOSTÁLOVÁ, Z.; CALVETE, J.J.; TÖPFER-PETERSEN E. Interaction of non-aggregated boar Awn-1 and Aqn-3 with phospholipid matrices. A model for coating of spermadhesins to the sperm surface. *Biol Chem Hoppe Seyler.*, v.376, p.237-242, 1995.
- DOSTÁLOVÁ, Z.; CALVETE, J.J.; SANZ, L.; et al. Quantitation of boar spermadhesins in accessory sex gland fluids and on the surface of epididymal, ejaculated and capacitated spermatozoa. *Biochim. Biophys Acta*, v.1200, p.48-54, 1994.

- DOTT, H.M.; HARRISON, R.A.; FOSTER, G.C. The maintenance of motility and surface properties of epididymal spermatozoa from bull, rabbit and ram in homologous seminal and epididymal plasma. *J. Reprod. Fertil.*, v.55, p.113-124, 1979.
- DOUGLAS-HAMILTON, D.H.; OSO, R.; OSOL, G. et al. A field study of the fertility of transported equine semen. *Theriogenology*, v.22, n.3, p.291-304, 1984.
- DZIUK, P. J.; HENSHAW, G. Fertility of boar semen artificially inseminated following in vitro storage. *J. Anim. Sci.*, v.17, p.554, 1958.
- EINARSSON, S.; MADEJ, A.; STERNING, M. Factors regulating initiation of oestrus in sows. *Reprod. Dom. Anim.*, v.33, p.119-123, 1998.
- ERIKSSON, B.M.; VASQUEZ, J.M.; MARTINEZ, E. et al. Effects of holding time during cooling and type of package on plasma membrane integrity, motility and in vitro oocyte penetration ability of frozen-thawed boar spermatozoa. *Theriogenology*, v.55, p.1593-1605, 2001.
- ERIKSSON, B.M., VASQUEZ, J.M., MARTINEZ, E., et al., Effects of holding time during cooling and type of package on plasma membrane integrity, motility and in vitro oocyte penetration ability of frozen-thawed boar spermatozoa. *Theriogenology*, v.55, p.1593-1605, 2005.
- ESTIENNE, M.J.; HARPER, A.F.; DAY, J.L. Characteristics of sperm motility in boar semen diluted in different extenders and stored for seven days at 18 degrees C. *Reprod. Biol.*, v.7, p.221-231, 2007.
- FAHMY, M.H. Factors influencing the weaning to oestrus interval in swine: a review. *W. Rev. Anim. Prod.*, v.17, n. 2, p.15-28, 1981.
- FLOWERS, W. L. Semen evaluation, extension, packaging and transport methods. In: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF SWINE PRACTITIONERS, 27., 1996, Nashville. **Proceedings...** Nashville: American Association of Swine Practitioners, 1996. p. 469-479.
- FLOWERS, W. Management of boars for efficient semen production. *J Reprod Fertil*, suppl. 52, p.67-78, 1997.
- FLOWERS, W.L. Water quality considerations for AI. *Pigs on Parade – Swine AI news bulletin from IMV*, v. 4, 1998.
- FLOWERS, W. L. Increasing fertilization rate of boars: Influence of number and quality of spermatozoa inseminated *J. Anim. Sci.*, v.80, p.47-53, 2002.
- FOOTE, R.H. Within-herd use of boar semen at 5°C, with a note on electronic monitoring of oestrus. *Reprod. Dom. Anim.*, v.37, p.61-63, 2002.
- FOOTE, R.H. Fertility estimation: a review of past experience and future prospects. *Anim. Reprod. Sci.*, v.75, p.119-39, 2003.
- FOULKES, J.A. The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa. *J Reprod Fertil.*, v. 49, p.277-284, 1977.
- FOULKES, J.A.; SWEASEY, D.; GOODEY, R.G. Fertility of bull spermatozoa in egg-yolk diluents of varied lipid fatty acid composition. *J Reprod Fertil.*, v.60, p.165-169, 1980.
- FOXCROFT, G.R. Nutritional and lactational regulation of fertility in sows. *J. Reprod. Fertil.*, suppl.,v.45, p.113-125, 1992.

- FOXCROFT, G.R.; DYCK, M.K.; RUIZ-SANCHEZ, A. et al. Identifying useable semen. *Theriogenology*, v.70, p.1324–1336, 2008.
- FRANCO, O.D.; MESA, H.; MEJÍA, J.G.V. et al. Evaluación de la integridad acrosomal y la funcionalidad bioquímica de la membrana espermática en cerdos reproductores con gotas citoplásmicas persistentes. *Revista Científica*, v.19, n° 5, p.500-505, 2009.
- FRANÇA, L.R.; AVELAR, G.F.; ALMEIDA, F.F.L. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology*, v.63, p.300-318, 2005.
- FRASER, L.; GORSZCZARUK, K.; STRZEŃEK, J. Relationship between motility and membrane integrity of boar spermatozoa in media varying in osmolality. *Reprod. Dom. Anim.*, v.36, p.325-329, 2001.
- FREI, B.; STOCKER, R.; ENGLAND, L. Ascorbate: the most effective antioxidant in human blood plasma. *Adv Exp Med Biol.*, v.264, p.155-163, 1990.
- FUNAHASHI, H.; NAGAI, T. Regulation of in vitro penetration of frozen-thawed boar spermatozoa by caffeine and adenosine. *Mol. Reprod. Dev.*, v.58, p.424-431, 2001.
- FUNAHASHI, H.; SANO, T. Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10°C. *Theriogenology*, v.63, p.1605-1616, 2005.
- FURTADO, C.S.; MELLAGI, A.P.G.; VARGAS, A.J. et al. Aspectos relevantes na avaliação da morfologia espermática do suíno. *Suinocultura em Foco*, v.17, p.04-05, 2006.
- GADEA, J. Predicción de la fertilidad "in vivo" de los eyaculados de verraco mediante parámetros rutinarios de contrastación seminal, pruebas bioquímicas y el test homólogo de penetración "in vitro". 1997. 116f. Ph.D. Thesis, Universidad de Murcia, Murcia.
- GADEA, J.; MATÁS, C.; LUCAS, X. Prediction of porcine semen fertility by homologous in vitro penetration (hIVP) assay. *Anim Reprod Sci.*, v.54, p.95–108, 1998.
- GADEA, J.; MATAS, C. Sperm factors related to in vitro penetration of porcine oocytes. *Theriogenology*, v.54, p.1343–1357, 2000.
- GADEA, J. Review: Semen extenders used in the artificial insemination of swine. . *Spanish J. Agr. Res.*, v.1, p.17-27, 2003.
- GADEA, J.; SELLÉS, E.; MARCO, M.A. The predictive value of porcine seminal parameters on fertility outcome under commercial conditions. *Reprod Domest Anim.*, v.39, p.1–6, 2004.
- GADEA, J. Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. *Theriogenology*, v.63, p.431-444, 2005.
- GADELLA, B.M.; VAN GESTEL, R.A. Bicarbonate and its role in mammalian sperm function. *Anim. Reprod. Sci.*, v.82–83, p.307–319, 2004.
- GALL, T. Fertility of intra-uterine vs. intra-cervical insemination of semen in swine. *J. Anim. Sci.*, suppl.2, v.46, 2002.
- GALLI, A.; BOSISIO, M. Quality of semen stored at +15/16 °C is related to fertility of artificially inseminated swine. *Theriogenology*, v.30, p.1185-1190, 1988.

- GARCIA, E.M.; VÁZQUEZ, J.M.; CALVETE, J.J. et al. Dissecting the protective effect of the seminal plasma spermadhesin PSP-I/PSP-II on boar sperm functionality. *J.Androl.*, v.27, p.434-443, 2006.
- GARCIA, E.M.; CALVETE, J.J.; SANZ, L. et al. Distinct effects of boar seminal plasma fractions exhibiting different protein profiles on the functionality of highly diluted boar spermatozoa. *Reprod. Dom. Anim.*, v.44, p.200-205, 2009.
- GARNER, D.L.; HAFEZ, E.S.E. Espermatozoides y plasma seminal. In: HAFEZ, E.S.E. (Eds). *Reproducción y inseminación artificial en animales*. 5ed. México: McGraw-Hill Interamericana, 1989. p.205-226.
- GARNER, D.L.; HAFEZ, E.S.E. Espermatozoides y plasma seminal. In: HAFEZ, E.S.E. (Eds). *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales*. 6ed. México: McGraw-Hill Interamericana, 1996. pp 158–179.
- GARNER, D.L.; THOMAS, C.A.; GRAVANCE, C.G. et al. Seminal Plasma addition attenuates the dilution effect on bovine sperm. *Theriogenology*, v.56, p.31-40, 2001.
- GATTI, J.L.; CASTELLA, S.; DACHEUX, F. et al. Post-testicular sperm environment and fertility. *Anim Reprod Sci.*, v.82, p.321-339, 2004.
- GHAOUI EL-HAJJ, R.; THOMSON, P.C.; EVANS, G. et al. Characterization and localization of membrane vesicles in ejaculate fractions from the ram, boar and stallion. *Reprod. Dom. Anim.*, v.39, p.173-180, 2004.
- GUEDES, R.M.C.; NOGUEIRA, R.H.G. The influence of parity order and body condition and serum hormones on weaning-to-estrus interval of sows. *Anim. Reprod. Sci.*, v.67, p.91-99, 2001.
- GILLAN, L.; MAXWELL, W.M.C. The functional integrity and fate of cryopreserved ram spermatozoa in the female tract. *J Reprod Fertil suppl*, v.54, p.271-283, 1999.
- GILLAN, L.; KROETSCH, T.; MAXWELL, W.M. et al. Assessment of in vitro sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. *Anim. Reprod. Sci.*, v.103, p.201-214, 2006.
- GOLDBERG, A.M.G. *Fatores de risco para a contaminação bacteriana durante a coleta do ejaculado suíno e suas conseqüências sobre a qualidade das doses inseminantes*. 2009. 44p. Dissertação de Mestrado (Mestre em Ciências Veterinárias – Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.
- GOTTARDI, L., BRUNEL, L., ZANELLI, L. New dilution media for artificial insemination in pig. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 9, 1980, Madrid. *Anais...* Madrid, 1980. v.5, p.49.
- GRAHAM, J.K.; FOOTE, R.H. Effect of several lipids, fatty acyl chain length, and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. *Cryobiology*, v.24, p.42–52, 1987.
- GROSSFELD, R.; KLINC, P.; SIEG, B. et al. Production of piglets with sexed semen employing a non-surgical insemination technique. *Theriogenology*, v.63, p.2269-2277, 2005.
- HANCOCK, J.L. The morphology of boar spermatozoa. *J. R. Microsc. Soc.*, v. 76, p.84-97, 1957.

- HANCOCK, J. L.; HOWELL, G.J.R. The collection of boar semen. *Vet. Rec.*, v.71, n.5, p.664-665, 1959.
- HARRISON, R.A.P; DOTT, H.M.; FOSTER, G.C. Effect of ionic strength, serum albumin and other macromolecules on the maintenance of motility and the surface of mammalian spermatozoa in a simple medium. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.52, p.65-73, 1978.
- HARRISON, R.A.; ASHWORTH, P.J.; MILLER, N.G. Bicarbonate/CO<sup>2</sup>, an effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes. *Mol. Reprod. Dev.*, v.45, p.378-391, 1996.
- HASHIZUME, T.; TANIMURA, I.; KANEMATSU, S. Morphological changes of the acrosome in boar spermatozoa during and after cell death. *Jpn. J. Anim. Reprod.*, v.36, p.35-39, 1990.
- HECK, A.; BORTOLOZZO, F.P.; WENTS, I. et al. Determinação do momento da ovulação em porcas de granjas comerciais via diagnóstico ultrasonográfico transcutâneo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS. 8, Foz de Iguaçu, Anais... Foz do Iguaçu:1997. p.333-334.
- HIRAI, M.; BOERSMA, A.; HOEFELICH, A. et al. Objectively measured sperm motility and sperm head morphometry in boars (*Sus scrofa*): relation to fertility and seminal plasma growth factors. *J. Androl.*, v.22, p.104-110, 2001.
- HOFMO, P.O. Commercial swine artificial insemination with liquid boar semen in Norway. *Reprod. Domest. Anim.*, suppl 1, v.1, p.317-320, 1991.
- HOFMO, P.O.; KOMMISRUUD, E.; SEHESTED, E. A field trial comparing the fertility of fresh semen stored in BTS for 2-3 days and MR-A for 4-5 days. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 15, 1998, Madrid. Proc... Madrid: v.3, p.64, 1998.
- HOLT, C.; HOLT, W.V.; MOORE, H.D. Choice of operating conditions to minimize sperm subpopulation sampling bias in the assessment of boar semen by computer-assisted semen analysis. *J Androl.*, v.17, p.587-96, 1996.
- HOLT, C.; HOLT, W.; MOORE, H. et al. Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: results of two fertility trials. *J Androl.*, v.18, p.312-323, 1997.
- HUEK, C. Untersuchungen zur Flüssigkonservierung von Pferdisperma unter Verwendung Verschiedener Kühl- und Transportsysteme – Laborstudie. 1990. 89p. Thesis (Master of Science) - Tierärztlichen Hochschule, Hannover.
- HURTGEN, J.P. Reproductive examination of the boar. *J. Soc. Theriogenol.*, v.8, p.1-48, 1984.
- HUSZAR, G.; WILLETTS, M.; CORRALES, M. Hyaluronic acid (sperm select) improves retention of sperm motility and velocity in normospermic and oligospermic specimens. *Fert. Ster.*, v.54, p.1127-1134, 1990.
- IRITANI, A.; NIWA, K.; IMAI, H. Sperm penetration in vitro of pig follicular oocytes matured in culture. *J Reprod Fertil.*, v.54, p.379-383, 1978.
- IVANOVA, M.; MOLLOVA, M. Zona-penetration in vitro test for evaluating boar sperm fertility. *Theriogenology*, v.40, p.397-410, 1993.

- JANKEVICIUTE, N., ZILINSKAS, H. Influence of some factors on semen quality of different breeds of boars. *Veter. Zootech.*, v.19, p.15–19, 2002.
- JANSEN, S.; EKHLASI-HUNDRIESER, M.; TOPFER-PETERSEN, E. Sperm adhesion molecules: structure and function. *Cells Tissues Organs.*, v.168, n. 1-2, p.82-92, 2001.
- JASKO, D.J., MORAN, D.M., FARLIN, M.E. et al. Pregnancy rates utilizing fresh, cooled, and frozen-thawed stallion semen. In: ANNUAL CONVENTION OF AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 38, 1992, Orlando. *Proceedings...* Orlando: American Association of Equine Practitioners, 1992. p.649-660.
- JOHNSON, L. A.; AALBERS, J. G.; WILLEMS, C. M. T. et al.. Use of boar spermatozoa for artificial insemination. I. Fertilizing capacity of fresh and frozen spermatozoa in sows on 36 farms. *J. Anim. Sci.*, v.52, p.1130–1136, 1981.
- JOHNSON, L. A., AALBERS, J. G.; WILLEMS, C. M. T. J et al. Use of boar spermatozoa for artificial insemination III. Fecundity of boar spermatozoa stored in Beltsville liquid and kiev extenders for three days at 18 C. *J. Anim. Sci.* v.54, p.132–136, 1982.
- JOHNSON, L.A.; AALBERS, J.G.; GROOTE, H.J.G. Artificial insemination of swine: Fecundity of boar semen stored in Beltsville Thawing Solution (BTS), modified modena (MM), or MR-A and inseminated on one, three and four days after collection. *Zuchthygiene*, v.23, p.49-55, 1988.
- JOHNSON, L.A.; WEITZE, K.F.; FISER P. et al. Storage of boar semen. *Anim Reprod Sci.*, v.62, p.143–172, 2000.
- JONÁKOVÁ, V.; MANÁSKOVÁ, P.; KRAUS, M. et al. Sperm surface proteins in mammalian fertilization. *Mol. Reprod. Dev.*, v.56, p.275-277, 2000.
- JONÁKOVÁ, V.; MANÁSKOVÁ, P.; TICHÁ, M. Separation, characterization and identification of boar seminal plasma proteins. *J. Chromatogr. B*, v.849, p.307-314, 2007.
- JONES, A.R.; CHANTRILL, L.A.; COKINAKIS, A. Metabolism of glycerol by mature boar spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, v.94, p.129–134, 1992.
- JONES, A.R. Metabolism of lactate by mature boar spermatozoa. *Reprod. Fertil. Develop.*, v.9, p.227–232, 1997.
- JOUANNET, P., DUCOT, B., FENEUX, D. et al. Male factors and the likelihood of pregnancy in infertile couples: I study of sperm characteristics. *Int. J. And.*, v.11, p.379-394, 1988.
- KANETO, M.; HARAYAMA, H.; MIYAKE, M.; et al. Capacitation-like alterations in cooled boar spermatozoa: assessment by the chlortetracycline staining assay and immunodetection of tyrosine-phosphorylated sperm proteins. *Anim. Reprod. Sci.*, v.73, p.197-209, 2002.
- KANWAR, K.C.; YANAGIMACHI, R.; LOPATA A. Effects of human seminal plasma on fertilizing capacity of human spermatozoa. *Fertil Steril.*, v.31, p.321-327, 1979.
- KASUYA, Y.; KAWABE, K. Studies on storage of boar semen at 5°C. 3. Preparation of skim milk-glucose extender for preservation of boar semen at 5°C. *Anim. Breed. Abstr.*, v.45, n.7, p.2409, 1977.

- KATO, S.; SHIBUKAWA, T.; HARAYAMA, H. et al. Timing of shedding and disintegration of cytoplasmic droplets from boar and goat spermatozoa. *J Reprod Develop.*, v.42, p.237-241, 1996.
- KATZER, L.H.; BERNARDI, M.L.; SILVA, L.E. et al. Comportamento de populações bacterianas presentes no sêmen suíno resfriado em diferentes temperaturas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS. 10, 2001, Porto Alegre-RS. Anais... Porto Alegre, v.2, p.247-248.
- KEMP, B.; SOEDE, N.M.; Relationship of weaning-to-estrus interval to timing of ovulation and fertilization in sows. *J. Anim. Sci.*, v.74, p.944-949, 1996.
- KEMP, B.; SOEDE, N.M.; LANGENDIJK, P. Effects of boar contact and housing conditions on estrus expression in sows. *Theriogenology*, v.63, p.643-656, 2005.
- KILLIAN, G.J.; CHAPMAN, D.A.; ROGOWSKI, L.A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. *Biol Reprod.*, v.49, p.1202-1207, 1993.
- KING, R.H.; WILLIAMS, I.H.; BAKER, T. The effect of diet during lactation on the reproductive performance of first-litter sows. *Proc. Aust. Soc. Anim. Prod.*, v.15, p.412-415, 1984.
- KIRKWOOD, R.N.; VADNAIS, M.L.; ABAD, M. Practical application of seminal plasma. *Theriogenology*, v.70, p.1364-1367, 2008.
- KOKETSU, Y.; DIAL, G.D. Factors influencing the postweaning reproductive performance of sows on commercial farms. *Theriogenology*. v 47, p.1445-1461, 1997.
- KOMMISRUDE, E.; PAULENZ, H.; SEHESTED, E. et al. Influence of boar and semen parameters on motility and acrosome integrity in liquid boar semen stored for five days. *Acta Vet Scand.*, v.43, p.49-55, 2002.
- KNOX, R.V.; RODRIGUEZ-ZAS, S.L. Factors influencing estrus and ovulation in weaned sows as determined by transrectal ultrasound. *J. Anim. Sci.*, v.79, p.2957-2963, 2001.
- KNOX, R.V.; MILLER, G.M.; WILLENBURG, K.L. et al. Effect of frequency of boar exposure and adjusted mating times on measures of reproductive performance in weaned sows. *J. Anim. Sci.* v.80, p.892-899, 2002.
- KOMMISRUDE, E.; PAULENZ, H.; SEHESTED, E. et al. Influence of boar and semen parameters on motility and acrosome integrity in liquid boar semen stored for five days. *Acta Veter. Scand.*, v.43, p.49-55, 2002.
- KORNIWICZ, D.; SZCZESNIAK-FABIANCZYK, B.; SMORAG, Z. The survival rate and fertilizing capacity of boar semen diluted with different diluents. *Reprod Domest Anim.*, v.31, p.273-274, 1996.
- KOS, M.; BILKEI, G. Prostaglandin F2alpha supplemented semen improves reproductive performance in artificially inseminated sows. *Anim. Reprod. Sci.*, v.80, p.113-120, 2004.
- KOUTSOTHEODOROS, F.; HUGHES, P.E.; PARR, R.A. et al. The effects of postweaning progestagen treatment (Regumate) of early-weaned primiparous sows on subsequent reproductive performance. *Anim. Reprod. Sci.*, v.52, p.71-79, 1998.
- KRUEGER, C.; RATH, D.; JOHNSON, L.A. Low dose insemination in

- synchronized gilts. *Theriogenology*, v.52, p.1363-1373, 1999.
- KRUEGER, C.; RATH, D. Intrauterine insemination in sows with reduced sperm number. *Reprod. Fertil. Dev.*, v.17, p.113-117, 2000.
- KRUGER, T.F.; MENKVELD, R.; STANDER, F.S. et al. Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fert. Ster.*, v.46, p.1118-1123, 1986.
- KUMMER, R.; POLEZE, E.; BERNARDI, M. L. et al. Caracterização do intervalo desmame-estro em uma granja produtora de suínos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 11, 2003, Goiânia. *Anais...* Goiânia, 2003, p. 189-190.
- KUNAVONGKRIT, A.; EINARSSON, S.; SETTERGREN, I. Follicular developments in primiparous lactating sows. *Anim. Reprod. Sci.*, v.5, p.47-56, 1982.
- KUSTER, C.E.; ALTHOUSE, G.C. The fecundity of porcine semen stored for 2 to 6 days in Androhep<sup>®</sup> and X-cell<sup>™</sup> extenders. *Theriogenology*, v.52, p.365-376, 1999.
- KUSTER, C.E.; HESS, R.A.; ALTHOUSE, G.C. Immunofluorescence reveals ubiquitination of retained distal cytoplasmic droplets on ejaculated porcine spermatozoa. *Journal of Andrology*, v.25, p.340-347, 2004.
- LAFORREST, J.P.; ALLARD, D. Comparison of four extenders for long-term storage of fresh boar semen. *Reprod. Domest Anim.*, v.31, p.275-276, 1996.
- LANGENDIJK, P.; BOUWMAN, E.G.; SCHAMS, D. Effects of different sexual stimuli on oxytocin release, uterine activity and receptive behaviour in estrous sows. *Theriogenology*, v.59, p.849-861, 2003.
- LAPIERRE, M. Artificial insemination: oestrus detection, timing, technique and application. In: SWINE ARTIFICIAL INSEMINATION CONFERENCE, 1994, Leman. Proc... Leman, Swine University of Minnesota, 1994, p. 19-32.
- LASLEY, F.; BOGART, R. A comparative study of epididymal and ejaculated spermatozoa of the boar. *J. Anim. Sci.*, v.3, n.3, p.360-370, 1944.
- LASLEY, J.F.; MAYER, D.T. A variable physiological factor necessary for the survival of bull spermatozoa. *J. Anim. Sci.*, n.3, p.121-135, 1944.
- LAZ ROZAS. Manual de Inseminación artificial porcina. *Madrid:Espanha KUBUS.S.A.*, 1999, p.125-131.
- LEENHOUWERS, J.I.; VAN DER LENDE, T.; KNOL, E.F. Analysis of stillbirth in different lines of pig. *Liv. Prod. Sci.*, v.57, p.243-253, 1999.
- LESHIN, L.S.; RAJ, S.M.; SMITH, C.K. et al. Immunostimulatory effects of pig seminal proteins on pig lymphocytes. *J. Reprod. Fertil.*, v.114, p.77-84, 1998.
- LEVIS, D.G. Hazard analysis of critical control points in an on-farm artificial insemination laboratory. In: GEORGE A. YOUNG SWINE CONFERENCE AND ANNUAL NEBRASKA SPF SWINE CONFERENCE. 38, 1997, Lincoln. Proc..., Lincoln: 1997, p.58-74.
- LEVIS, D. Liquid boar semen production: current extender technology and where do we go from here! In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BOAR SEMEN PRESERVATION. 4., 2000, Beltsville, Maryland USA. Proceedings... Beltsville, p.121-128, 2000.

- LIBERDA, J.; MANÁSKOVÁ, P.; PRELOVSKÁ, L.; et al. Saccharide-mediated interactions of boar sperm surface proteins with components of the porcine oviduct. *J. Reprod. Immunol.*, v.71, p.112-125, 2006.
- LINDBLOM, B.; HAMBERGER, L.; WIQVIST, N. Differentiated contractile effects of prostaglandins E and F on the isolated circular and longitudinal smooth muscle of the human oviduct. *Fert. Ster.*, v.30, p.553-559, 1978.
- LIU, Z.; FOOTE, R.H. Bull sperm motility and membrane integrity in media varying in osmolality. *J. Dai. Sci.*, v.81, p.1868-1873, 1998.
- LOVELL, J.E.; GETTY, R. Fate of semen in the uterus of the sow: histologic study of endometrium during the 27 h after natural service. *Am. J. Vet. Res.*, v.29; p.609-625, 1968.
- LUCIA JR., T.; CORRÊA, M.N.; DESCHAMPS, J.C. et al. Risk factors for stillbirth in two swine farms in the south of Brazil. *Prev. Vet. Med.*, v.53, p.285-292, 2002.
- LYCZYNSKI, A.; KOLAT, K. Boar semen preservation in MR-A diluent. *Reprod. Dom. Anim.*, v.31, p.271-272, 1996.
- MABRY, J.W.; CULBERTSON, M.S.; REEVES, D. Effects of lactation length on weaning-to-first-service interval, first-service farrowing rate and subsequent litter size. *Swi. Heal. Prod.*, v.4, n.4, p.185-187, 1996.
- MACDONALD, B.J.; FOULKES, J.A. A spectrofluorometric investigation, using 1-*il*inonaphthalen-8-sulphonate, of the interaction between washed bovine spermatozoa and seminal plasma or egg-yolk lipoprotein. *J. Reprod. Fertil.*, v.63, p.407-414, 1981.
- MAFFILI, V.V.; TORRES, C.A.A.; COSTA, E.P. Efeito da ordem de parto sobre o intervalo desmama-estro e o número de leitões nascidos totais no parto subsequente numa granja localizada na região de Ponte Nova – Minas Gerais. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA. 11, 2000, Belo Horizonte. Anais... Belo Horizonte, 2000, p. 649.
- MANÁSKOVÁ, P.; LIBERDA, J.; TICHÁ, M.; et al. Aggregated and monomeric forms of proteins in boar seminal plasma: characterization and binding properties. *Folia Biol.*, v.46, p.143-151, 2000.
- MANASKOVA P, LIBERDA J, TICHA M, JONAKOVA V. Isolation of non-heparin-binding and heparin-binding proteins of boar prostate. *J. Chrom. B Analyt. Technol. Biomed. Lif. Sci.*, v.770, p.137-143, 2002.
- MANÁSKOVÁ, P.; JONÁKOVÁ, V. Localization of porcine seminal plasma (PSP) proteins in the boar reproductive tract and spermatozoa. *J. Reprod. Immunol.*, v.78, p.40-48, 2008.
- MANJUNATH, P.; THERIEN, I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *J. Reprod. Immunol.*, v.53, p.109-119, 2002.
- MANN, T. *The Biochemistry of semen and of the male reproductive tract*. London: Methuen and Co., 1964, 493p.
- MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. *Male reproductive function and semen. Themes and trends in physiology, biochemistry and investigative andrology*. Berlin: Springer-Verlag, 1981,495p.
- MARCHETTI, A.N. Qualidade da água utilizada em laboratórios de centrais de

- inseminação artificial. *Curso de inseminação Artificial em suínos – Minitub e UFRGS*. 2008.
- MARÍN, S.; CHIANG, K.; BASSILIAN, S. et al. Metabolic strategy of boar spermatozoa revealed by a metabolomic characterization. *FEBS Lett*, v.554, p.342–346, 2003.
- MARTÍN RILLO S. How AI is progressing in Spain. *Pig Int.*, v.5, p.24 – 28, 1984.
- MARTIN-RILLO, S.; MARTINEZ, E.; GARCIA ARTIGA, C. Boar semen evaluation in practise. *Reprod. Dom. Anim.*, v.31, p.519-526, 1996.
- MARTIN RILLO, S.; GRANADOS, L.; RUVALCABA, J.A.G.; I.A Porcina: Situacion actual y tecnologia. In: CONGRESO NACIONAL DE REPRODUCTION PORCINA. 3, 1994. Rosario, Argentina, Anais..., Rosario, Argentina: 1994, p.65-78.
- MARTINEZ, E.; RUIZ, S.; SEBÁSTIAN, J. et al. Factores que afectan a la inseminación artificial porcina. *An. Vet. Murcia*, v.2, p.115-120, 1986.
- MARTINEZ, E.; VAZQUEZ, J.M.; MATAS, C. et al. Evaluation of boar spermatozoa penetrating capacity using pig oocytes at the germinal vesicle stage. *Theriogenology*, v.40, p.547-557, 1993.
- MARTINEZ, E.A.; VAZQUEZ, J.M.; ROCA, J. Successful non-surgical deep intrauterine insemination with small numbers of spermatozoa in sows. *Reproduction*, v.122, p.289-296, 2001.
- MARTINEZ, E.A.; VAZQUEZ, J.M.; ROCA, J. et al. Minimum number of spermatozoa required for normal fertility alter deep intrauterine insemination in non-sedated sows. *Reproduction*, v.123, p.163-170. 2002.
- MATTHIJS, A.; ENGEL, B.; WOELDERS, H. Neutrophil recruitment and phagocytosis of boar spermatozoa after artificial insemination of sows, and the effects of inseminate volume, sperm dose and specific additives in the extender. *Reproduction*, v.125, p.357–367, 2003.
- MAXWELL, W.M.C.; WELCH, G.R.; JOHNSON, L.A. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reprod. Fertil. Dev.*, v.8, p.1165-1178, 1996.
- MAXWELL, W.M.C.; JOHNSON, L.A. Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. *Theriogenology*, v.48, p.209-219, 1997.
- MAXWELL, W.M.C.; JOHNSON, L.A. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. *Theriogenology*, v.52, p.1353-1362, 1999.
- MAXWELL, W.M.C.; DE GRAAF, S.P.; EL-HAJJ GHAOUI, R. et al. Seminal plasma effects on sperm handling and fertility. *Soc. J. Reprod. Fertil. Suppl.*, n.67, p. 13 - 38, 2007.
- MBURU, J.N., EINARSSON, S., DALIN, A.-M. et al. Ovulation as determined by transrectal ultrasonography in multiparous sows: relationships with oestrous symptoms and hormonal profiles. *J. Vet. Med. A.*, v.42, p.285-292, 1995.
- MEDING, J.H. AI in pigs: influence of boar seminal plasma on breeding efficiency of diluted boar semen. *Nord. Vet. Med.*, v.28, p.221-225, 1976.
- MEDRANO, A.; PEÑA, A.; RIGAU, T. et al. Citrate and lactate as feasible energy

- sources for boar spermatozoa. *Reprod. Dom. Anim.*, v.38, p.340, 2003.
- MENGELING, W.L., LANGER, K.M., VORWALD, A.C. The effect of porcine parvovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus on porcine reproductive performance. *Anim. Reprod. Sci.*, v.60–61, p.199–210, 2000.
- METZ KW, BERGER T, CLEGG ED. Adsorption of seminal plasma proteins by boar spermatozoa. *Theriogenology*, v.34, p.691-700, 1990.
- MILLER, J. *Diferentes concentrações espermáticas na inseminação artificial intra-uterina suína*. 2007, 57p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), UFPA, Lavras.
- MINELLI, A.; ALLEGRUCCI, C.; LIGUORI, L. et al Ecto-diadenosine polyphosphates hydrolase activity on human prostasomes. *The Prostate*, v.51, n.1, p.1-9, 2002.
- MOORE, A.I.; SQUIRES, E.L.; GRAHAN, J.K. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. *Theriogenology*, v.63, p.2372-2381, 2005.
- MORETTI, J. Artificial insemination of swine: fertility using several liquid semen diluents. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 8, 1981, Ghent, Belgium. Proc... Ghent: p 293, 1981.
- MOURA, A.A.; KOC, H.; CHAPMAN, D.A. et al. Identification of proteins in the accessory sex gland fluid associated with fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. *J. Androl.*, v.27, p.201-11, 2006.
- MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A. et al. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: Cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, v.57, p.1695–1706, 2002.
- MUIRHEAD, M.R., ALEXANDER, T.J.L. *Managing pig health and the treatment of disease: a reference for the farm*. 1ed. Sheffield: 5M Enterprises, 1997. 610p.
- MULLER-SHLOSSER, F.; HEYDORN, K.P.; PAUFLER, S. Preliminary investigations on the effect of different types of heat-conserving packaging on fresh boar semen during transfer. *Pigs News Inf.*, v.3, 1982.
- NAGAI, T.; NIWA, K.; IRITANI, A. Effect of sperm concentration during preincubation in a defined medium on fertilization in vitro of pig follicular oocytes. *J Reprod Fertil.*, v.70, p.271-275, 1984.
- NASCIMENTO, E.F.; SILVA FILHO, J.M.; NASCIMENTO, J.K. Efeito dos diluidores e do resfriamento do sêmen a 16°C e 5°C sobre algumas características espermáticas de varrões. *Arq. Brasil. Med. Vet. Zoot.*, v.52, n.2, p.141-146, 1998.
- NASSAR, A.; MORSHEDI, M.; MAHONY, M. et al. Pentoxifylline stimulates various sperm motion parameters and cervical mucus penetrability in patients with asthenozoospermia. *Andrologia*, v.31, p.9-15, 1999.
- NEWTH, M.S.; LEVIS, D.G. Change in pH boar semen extenders. *Nebraska Swine Report*, p.3-6, 1999.
- NISSEN AK, SOEDE NM, HYTTEL P, SCHMIDT M, D'HOORE L. The influence of time of insemination relative to time of ovulation on farrowing frequency and litter size in sows as investigated by ultrasonography. *Theriogenology*, v.47, p.1571–1582, 1997.

- NOVAK, S.; RUIZ-SÁNCHEZ, A.; DIXON, W. T. et al. Seminal Plasma Proteins as Potential Markers of Relative Fertility in Boars. *J Androl.*, 2009.
- OEHNINGER, S.; ACOSTA, A.A.; MORSHEDI, M. et al. Corrective measures and pregnancy outcome in in vitro fertilization in patients with severe sperm morphology abnormalities. *Fert. Ster.*, v.50, p.283-287, 1988.
- OKAMURA, N.; TAJIMA, Y.; SOEJIMA, A. et al. Sodium bicarbonate in seminal plasma stimulates the motility of mammalian spermatozoa through direct activation of adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* V.260, p.9699-9705, 1985.
- O'LEARY, S.; JASPER, M.J.; WARNES, G.M. et al. Seminal plasma regulates endometrial cytokine expression, leukocyte recruitment and embryo development in the pig. *Reproduction*, v.128, p.237-247, 2004.
- PALHARES, M.S. *Adequação de um novo contêiner para o transporte do sêmen equino diluído e resfriado: I- Características termodinâmicas e funcionais; II- desempenho reprodutivo das éguas inseminadas.* 1997. 246p. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- PALMER, W.M.; TEAGUE, H.S.; VENZKE, W.G. Macroscopic observations on the reproductive tract of the sow during lactation and early postweaning. *J. Anim. Sci.*, v.24, p.541-545, 1965.
- PALMER, W.M.; TEAGUE, H.S.; VENZKE, W.G. Histological changes in the reproductive tract of the sow during lactation and early postweaning. *J. Anim. Sci.*, v.24, p.1117-1125, 1965b.
- PALMER, E. Factors affecting stallion semen survival and fertility. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 10, 1984, Urbana, *Proc...Urbana: University of Illionois*, 1984, v.3, p.377-379.
- PALMERINI, C.A.; CARLINI, E.; NICOLUCCI, A. et al. Increase of human spermatozoa intracellular  $Ca^{2+}$  concentration after fusion with prostasomes. *Cell Calcium*, v.25, p.291-296, 1999.
- PALMERINI, C.A.; SACCARDI, C.; CARLINI, E. et al. Fusion of prostasomes to human spermatozoa stimulates the acrosome reaction. *Fertil Steril.*, v.80, n.5, p.1181-1184, 2003.
- PARK, C.S.; CHEON, Y.M.; XU, Z. Comparison of preservation of liquid boar semen between lactose-egg yolk and Butschwiler diluents. *Reprod. Dom. Anim.*, v.31, p.269, 1996.
- PAULENZ, H.; KOMMISRUD, E.; HOFMO, P.O. Effect of long-term storage at different temperatures on the quality of liquid boar semen. *Reprod. Dom. Anim.*, v.35, n.2, p.83-87, 2000.
- PAQUIGNON, M. Semen technology in the pig. *Curr. Top. Vet. Med. Anim. Sci.*, 1984.
- PEÑA, F.J.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M. et al. Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. *Anim. Reprod. Sci.*, v.78(1-2), p.85-98, 2003.
- PEÑA, F.J.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M. et al. Antioxidant supplementation of boar spermatozoa from

different fractions of the ejaculate improves cryopreservation: changes in sperm membrane lipid architecture. *Zygote*, v.12, p.117-24, 2004a.

PEÑA, F.J.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M. et al. Effect of hyaluronan supplementation on boar sperm motility and membrane lipid architecture status after cryopreservation. *Theriogenology*, v.61, p.63-70, 2004b.

PEÑA, F.J.; SARAVIA, F.; NUÑEZ-MARTINEZ, I. et al. Do different portions of the boar ejaculate vary in their ability to sustain cryopreservation? *Anim. Reprod. Sci.*, v. 93, p.101-113, 2006.

PÉREZ-LLANO, B.; LORENZO, J.L.; YENES, P. A short hypoosmotic swelling test for the prediction of boar sperm fertility. *Theriogenology*, v.53, p.387-398, 2001.

PEREZ MARCOS, C.; SANCHEZ, R.; PALACIO, M. et al. Effect of dilution rate on the motility and acrossome morphology of boar spermatozoa stored at 15°C. *Reprod. Dom. Anim.*, v.26, p112-116, 1991.

PÉREZ-PÉ, R.; BARRIOS, B.; MUIÑO-BLANCO, T. et al. Seasonal differences in ram seasonal plasma revealed by partition in an aqueous two-phase system. *J Chromat. B*, v.760, p.113-121, 2001.

PERRY, G.C.; PATTERSON, R.L.S.; MACFIE, H.J.H. et al. Pig courtship behaviour: pheromonal property of androstenone steroids in male submaxillary secretion. *Anim. Prod.*, v.31, p.191-199, 1980.

PETRUNKINA, A.M.; GEHLHAAR, R.; DROMMER, W. et al. Selective sperm binding to pig oviductal epithelium in vitro. *Reproduction*, v.121, p.889-896, 2001.

PHILPOTT, M. The dangers of disease transmission by artificial insemination and embryo transfer. *Br. Vet. J.*, v.149, p.339-369, 1993.

PIEHL, L.; CISALE, H.; TORRES, N. et al. Biochemical characterization and membrane fluidity of membranous vesicles isolated from boar seminal plasma. *Anim Reprod Sci.*, v.92, p.401-410, 2006.

PINART, E., CAMPS, R., BRIZ, M. et al. Unilateral spontaneous abdominal cryptorchidism: structural and ultrastructural study of sperm morphology. *Anim. Reprod. Sci.*, v.49, p.247-268, 1988.

PINART, E.; CAMPS, R.; BRIZ, M., et al. Unilateral spontaneous abdominal cryptorchidism: structural and ultrastructural study of sperm morphology. *Animal Reproduction Science*, v.49, p.247-268, 1998.

PINART, E.; SANCHO, S.; BRIZ, M. et al. Characterization of the semen quality of postpuberal boars with spontaneous unilateral abdominal cryptorchidism on the right side. *An. Reprod. Sci.*, v.55, p.269-278, 1999.

PLISKO, N.T. Method of prolonging the viability and fertilizing capacity of boar spermatozoa. *Svinovodstvo*, v.9, p.37-41, 1965.

POLEZE, E. *Caracterização do interval desmame – estro e efeito de sua variação no desempenho reprodutivo de fêmeas suínas*. 2004. 66p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias – Reprodução Animal) – Faculdade de Veterinária da UFRGS, Porto Alegre.

POLEZE, E.; KUMMER, R.; BERNARDI, M. L.; SOARES. et al. Reproductive consequences of the variation in weaning to oestrus interval in swine. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY

- SOCIETY CONGRESS, 18, 2004, Hamburg. Proc... Hamburg, 2004, v.2., p.475.
- POLGE, C. Artificial insemination in pigs. *Vet. Rec.*, v.68, p.62-75, 1956.
- POPE, W. F.; XIE, S.; BROERMANN, D.M. et al. Causes and consequences of early embryonic diversity in pigs. *J. Reprod. Fertil.*, suppl., v. 40, p.251-260, 1990.
- PRUNEDA, A.; PINART, E.; BRIZ, M.D. et al. Effects of a high semen-collection frequency on the quality of sperm from ejaculates and from six epididymal regions in boars. *Theriogenology*, v.63, p.2219-2232, 2005.
- PUKAZHENTHI, B.; NOILES, E.; PELICAN, K. et al. Osmotic effects on feline spermatozoa from normospermic versus teratospermic donors. *Cryobiology*, v.40, p.139-150, 2000.
- PURSEL, V.G., JOHNSON, L.A.; RAMPACEK, G.B. Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. *J. Anim. Sci.*, v.34, p. 278-283, 1972.
- PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A.; SCHULMAN, L.L. Effect of dilution, seminal plasma and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa. *J. Anim. Sci.*, v.37, p.528-531, 1973.
- PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A. Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J Anim Sci*, v.40, p.99-102, 1975.
- QUINN, P.J.; CHOW, P.Y.; WHITE, I.G. Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. *J Reprod Fertil.*, v.60, p.403-407, 1980.
- RATH, D.; NIEMANN, H. In vitro fertilization of porcine oocytes with fresh and frozen-thawed ejaculated or frozen-thawed epididymal semen obtained from identical boars. *Theriogenology*, v.47, p.785-793, 1997.
- RATH, D.; JOHNSON, L.A.; DOBRINSKY, J.R. et al. Production of piglets preselected for sex following in vitro fertilization with X and Y chromosome-bearing spermatozoa sorted by flow cytometry. *Theriogenology*, v.47, p.795-800, 1997.
- RATH, D.; KRUEGER, C.; JOHNSON, L.A. Low dose insemination technique in the pig. In: LA Johnson and HD Guthrie (Eds), *Boar Semen Preservation IV*. Allen Press Inc., Lawrence, KS. p.115-118, 2000.
- RATTO, J.; JOKINEN, L. Reports about number of swine inseminations and farrowing results in Finland 1989, comparison between two diluents EDTA and MRA. *Reprod. Dom. Anim.*, suppl 1, p.365-368, 1990.
- REES, J.M.; FORD, W.C.; HULL, M.G. Effect of caffeine and of pentoxifylline on the motility and metabolism of human spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, v.90, p.147-156, 1990.
- RIGAU, T.; PIEDRAFITA, J.; REVERTER, A. et al. The rate of L-lactate production: a feasible parameter for the fresh diluted boar semen quality analysis. *Anim. Reprod. Sci.*, v.43, p.161-172, 1996.
- RIGAU, T.; RIVERA, M.; PALOMO, M.J. Differential effects of glucose and fructose on hexose metabolism in dog

spermatozoa. *Reproduction*, v.123, p.579-591, 2002.

ROBERTSON, S.A. Seminal fluid signaling in the female reproductive tract: lessons from rodents and pigs. *J. Anim. Sci.*, suppl. E39, v.85, p.36-44, 2007.

ROCA, J.; CARVAJAL, G.; LUCAS, X. et al. Fertility of weaned sows after deep intrauterine insemination with a reduced number of frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology*, v.60, p.77-87, 2003.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; EKSTEDT, E.; EINARSSON, S. Acidification of epididymal fluid in the boar. *Int. J. And.*, v.13, p.238-43, 1990.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Aspects of the electrolytic composition of boar epididymal fluid with reference to sperm maturation and storage. *Reprod. Dom. Anim.*, suppl 1, p.13-27, 1991.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; IBORRA, A.; MARTÍNEZ, P. et al. Immunoelectronmicroscopic imaging of spermadhesin AWN epitopes on boar spermatozoa bound in vivo to the zona pellucida. *Reprod. Fertil. Dev.*, v.10, p.491-497, 1998.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; TIENHAI, P.; SUZUKI, K. Involvement of oviduct in sperm capacitation and oocyte development in pigs. *Reproduction Supplement*, v.58, p.129-145, 2001.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H., SARAVIA, F., WALLGREN, M. et al. Boar spermatozoa in the oviduct. *Theriogenology*, v.63, p.514-35, 2005.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Role of the oviduct in sperm capacitation. *Theriogenology*, v.68, p.138-146, 2007.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; SARAVIA, F.; WALLGREN, M. et al. Influence of seminal plasma on the kinematics of boar spermatozoa during freezing. *Theriogenology*, v.70, p.1242-1250, 2008.

ROJANASTHIEN, S.; EINARSSON, S.; SETTERGREN, I. Follicular development in lactating, post weaning and anoestrous primiparous sows. *Acta Vet. Scand.*, v.28, p.421-427, 1987.

ROJKITTIKHUN, T.; STERNING, M.; RYDHMER, L. et al. Oestrous symptoms and plasma levels of oestradiol -17 $\beta$  in relation to the interval from weaning to oestrus in primiparous sows. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 12, 1992, p.485.

ROMERO, A.; ROMAO, M.J.; VARELA, P.F. et al. The crystal structures of two spermadhesins reveal the CUB domain fold. *Nat Struct Biol.*, v.4, p.783-788, 1997.

RONER, M.N.B.; SILVA FILHO, J.M.; PALHARES, M.S. et al. Desenvolvimento de um sistema de resfriamento e conservação de sêmen suíno. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.58, p.78-86, 2006.

ROY, A.C.; RATNAM, S.S. Biosynthesis of prostaglandins by human spermatozoa in vitro and their role in acrosome reaction and fertilization. *Mol. Reprod. Dev.*, v.33, p.303-306, 1992.

ROZEBOOM, K. J.; TROEDSSON, M.H.T.; SHURSON, G. C. et al. Late Estrus or metestrus insemination after estrual inseminations decreases farrowing rate and litter size in swine. *J. Anim. Sci.*, v.75, p.2323-2327, 1997.

- ROZEBOOM, K.J.; TROEDSSON, M.H.T.; MOLITOR, T.W. ET AL. The effect of spermatozoa and seminal plasma on leukocyte migration into the uterus of gilts. *J. Anim. Sci.*, v.77, p.2201-2206, 1999.
- ROZEBOOM, K.J. Evaluating of Boar Semen Quality. Animal Science Facts, ANS00 – 812S, 1-7, 1/06/2000. Disponível em <[http://www.ncsu.edu/project/swine\\_extension/publications](http://www.ncsu.edu/project/swine_extension/publications)>. 14/02/2009.
- ROZEBOOM, K.; TROEDSSON, M.; HODSON, H.H.; et al. The importance of seminal plasma on the fertility of subsequent artificial insemination in swine. *J. Anim. Sci.*, v.78, p.443-448, 2000.
- ROZEBOOM, K.J.; REICKS, D.L.; WILSON, M.E. The reproductive performance and factors affecting on-farm application of low-dose intrauterine deposit of semen in sows. *J. Anim. Sci.*, v.82, p.2164-2168, 2004.
- RUVALCABA, J.A.G. Improvement in reproductive performance in pigs with artificial insemination and MR-A long term preservation diluent. In: ANNUAL MEETING OF AMERICAN ASSOCIATION OF SWINE PRACTITIONERS, 25, 1994, Nebraska, Proc...Nebraska: 1994, p.1-5.
- RYDHMER, L. Genetics of sow reproduction, including puberty, oestrus, pregnancy, farrowing and lactation. *Livest. Prod. Sci.*, v.66, p.1-12, 2000.
- SAACKE, R.G.; DALTON, J.C.; NADIR, S. et al. Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. *Anim. Reprod. Sci.*, v.60-61, p.663-677, 2000.
- SAACKE, R.G. Sperm morphology: Its relevance to compensable and un-compensable traits in semen. *Theriogenology*, v.70, p.473-478, 2008.
- SALISBURY, G.W.; VANDERMARK, N.L.; LODGE, J.R. *Physiology of Reproduction and Artificial Insemination in Cattle*. 2ed. San Francisco: W. H. Freeman & Co. Ltd., 1961, 798p.
- SANZ, L.; CALVETE, J.J.; MANN, K. ET AL. The complete primary structure of the spermadhesin AWN, a zona pellucida-binding protein isolated from boar spermatozoa. *FEBS Lett*, v.300, p.213-218, 1992.
- SARAVIA, F.; HERNÁNDEZ, M.; WALLGREN, M. et al. Controlled cooling during semen criopreservation does not induce capacitation of spermatozoa from two portions of the boar ejaculate. *Int. J. Androl.*, v.30, p.485-499, 2007.
- SARAVIA, F.; WALLGREN, M.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Optimization of cryopreservation of boar semen in MiniFlatPacks by using a simpler protocol and a specific portion of the ejaculate. *Reprod. Domest. Anim.*, v.43, p.181, 2008.
- SARAVIA, F. *Cryopreservation of boar semen*. 2008. 63p. Doctoral Thesis. Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.
- SARAVIA, F.; WALLGREN, M.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Freezing of boar semen can be simplified by handling a specific portion of the ejaculate with a shorter procedure and MiniFlatPack packaging. *Anim Reprod Sci.*, v.117(3-4), p.279-287, 2010.
- SBRACIA, M.; GRASSO, J.; SYAME, N. et al. Hyaluronic acid substantially increases the retention of motility in

- cryopreserved/thawed human spermatozoa. *Hum. Reprod.*, v.12, p.1949-1954, 1997.
- SCHEID, I.R.; WENTZ, I.; KICH, J.D. Toxicidade das luvas de coleta ao sêmen suíno. In: *CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS*. 7., 1995. Blumenau – SC. *Anais*. Concórdia EMBRAPA – CNPSA. P. 148. 1995.
- SCHILLING, E.; VENGUST, M. Osmotic pressure of boar semen. *Reprod. Dom. Anim.*, v.21, p. 33-34, 1986.
- SCHNEIDER, L.G. *Natimortalidade suína em granjas industriais: distribuição, qualidade dos registros do parto e causas associadas à natimortalidade pré-parto, intraparto e pós-nascimento*. 2002. 96f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Faculdade de Veterinária da UFRGS, Porto Alegre.
- SCHNEIDER, L.G.; COSTI, G.; WENTZ, I. Avaliação da mumificação fetal suína em uma granja industrial. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.27, n.4, p.678–683, 2003.
- SEIDEL, G.E.; ALLEN, C.H.; JOHNSON, L.A. et al. Uterine horn insemination of heifers with very low numbers of non frozen and sexed spermatozoa. *Theriogenology*, v.48, p.1255-1264, 1997.
- SELLÉS, E.; WALGREN, M.; GADEA, J. et al. Sperm viability and capacitation-like changes in fractions of boar semen after storage and freezing. In: *INTERNATIONAL CONFERENCE ON PIG REPRODUCTION*, 6, 2001, Missouri, Proc... Missouri, 2001.
- SESTI, L.A.C.; BRITT, J.H. Secretion of gonadotropins and estimated releasable pools of gonadotropin-releasing hormone and gonadotropins during establishment of suckling induced inhibition of gonadotropin secretion in the sow. *Biol. Reprod.*, v.50, p.1078-1086, 1994.
- SESTI, L.A.C.; BRITT, J.H. Relationship of secretion of GnRH in vitro to changes in pituitary concentrations of LH and FSH and serum concentrations of LH during lactation in sows. *J. Reprod. Fertil.*, v.98, p.393-400, 1993a.
- SETCHELL, B.P. Male reproductive organs and semen. In: CUPPS, P.T. (Eds). *Reproduction in Domestic Animals*. California: Academic Press Inc. San Diego, 1991. p.221-249.
- SETTERGREN, I.; NICANDER, L. Formation and fine structure of abnormal mitochondrial sheaths in spermatozoa of an infertile boar. In: *International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination*, 7, Munique, 1972, Proceedings: Munique, 1972, v.1, p.459-462.
- SHANNON, P.; CURSON, B. Effect of egg yolk levels on the fertility of diluted bovine sperm stored at ambient temperatures. *N Z J Agric Res.*, v.26, p.187–189, 1983.
- SHAW, H.J.; FOXCROFT, G.R. Relationships between LH, FSH and prolactin secretion and reproductive activity in the weaned sow. *J. Reprod. Fertil.*, v.75, p.17-28, 1985.
- SHIPLEY, C. Breeding soundness examination in the boar. *Swine Health Prod.*, v.7, p.117–120, 1999.
- SICILIANO, L.; MARCIANÒ, V.; CARPINO, A.. Prostatome-like vesicles stimulate acrosome reaction of pig spermatozoa. *Reprod. Bio. Endoc.*, v.6:5, p.1-7, 2008.
- SIGNORET, J.P. The mating behaviour of the sow. In: Cole, D.J.A. (Ed.), *Pig*

Production. Butterworths, UK, 1971, pp. 295–313.

SILVA FILHO, J.M. *Aspectos do manejo reprodutivo e do sêmen na inseminação artificial de éguas*. 1994, 408p. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

SILVA, C.H.P.M.; LINS, A.P.; CRUZ, C.S.O. et al. Caracterização dos biofilmes formados em filtros de carvão ativado de sistemas de purificação de água em laboratórios clínicos. *Rev. Bras. Anal. Clin.*, v. 38, n. 4, p. 243-253, 2006.

SILVA, P.F.N.; GADELLA, B.M. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*, v.65, n.5, p.958-978, 2006.

SILVEIRA, P.R.S.; LAIS, I. Curso de inseminação artificial em suínos. EMBRAPA Suínos e Aves, Concórdia, SC, 20p. 1999.

SIMS, L.D.; GLASTONBURY, J.R.W. Neonatal mortality. In: SIMN, L.D.; GLASTONBURY, J.W.R. (Eds). *Pathology of the pig: a diagnostic guide*. Bartoon: The pig research and development corporation, 1996. p.423-432.

SMITAL, J. Effects influencing boar semen. *Anim. Reprod. Sci.*, v.110, p.335–346, 2009.

SOEDE, N.M., HELMOND, F.A., KEMP, B. Perioovulatory profiles of oestradiol, LH and progesterone in relation to oestrus and embryo mortality in multiparous sows using transrectal ultrasonography to detect ovulation. *J. Reprod. Fertil.*, v.101, p.633-641, 1994.

SOEDE, N.M.; WETZELS, C.C.H.; ZONDAG, W. et al. Effects of time of insemination relative to ovulation, as

determined by ultrasonography, on fertilization rate and accessory sperm count in sows. *J. Reprod. Fert.*, v.104, p.99-106, 1995a.

SOEDE, N.M., WETZELS, C.C.H., ZONDAG, W. et al. Effects of a second insemination after ovulation on fertilization rate and accessory sperm count in sows. *J. Reprod. Fertil.*, v.105, p.135-140, 1995b

SOEDE, N.M.; WETZELS, C.C.H.; KEMP, B. Oestrus (Standing response for boar and man) and ovulation in sows. *Reprod. Dom. Anim.*, v.31, n.1, p.293-294, 1996.

SOEDE NM, KEMP B. Expression of oestrus and timing of ovulation in pigs. *J. Reprod. Fertil.*, suppl., v.52, p.91–103, 1997.

SOEDE, N.M.; STEVERINK, D.W.B.; LANGENDIJK, P.; KEMP.B. Optimized insemination strategies in swine AI. In. BOAR SEMEN PRESERVATION IV, 1999, Beltsville, Procs...Beltsville: 2000, p.185-192.

SONDERMAN, J.P.; LUEBBE, J.J. Semen production and fertility issues related to differences in genetic lines of boars. *Theriogenology* v.70, p.1380-1383, 2008.

STEN-KNUDSEN, O. *Biological Membranes: Theory of transport potentials and electric impulses*. 1ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2002. 671p.

STEVENSON, J.S.; BRITT, J.H. Luteinizing hormone, total estrogens and progesterone secretion during lactation and after weaning in sows. *Theriogenology*, v.14, p.453-461, 1980.

STEVENSON, J.S.; COX, N.M.; BRITT, J.H. Role of the ovary in controlling luteinizing hormone, follicle-stimulating

hormone, and prolactin secretion during and after lactation in pigs. *Biol. Reprod.*, v.24, p.341-353, 1981.

STEVERINK, D.W.B.; SOEDE, N.M.; BOUWMAN, E.G. et al. Influence of insemination-ovulation interval and sperm cell dose on fertilization in sows. *J. Reprod. Fertil.*, v.111, p.165-171, 1997.

STEVERINK, D.W.B.; SOEDE, N.M.; GROENLAND, G.J.R. Duration of estrus in relation to reproduction results in pigs on commercial farms. *J. Anim. Sci.*, v.77, p.801-809, 1999.

STOKHOF, S., SOEDE, N.M., KEMP, B. Vaginal mucus conductivity as measured by Walsmeta MKIV does not accurately predict the moment of ovulation or the optimum time for insemination in sows. *Anim. Reprod. Sci.*, v.41, p.305-310, 1996.

STRZEZEK, J.; HOPFER, E.; ZABORNIK, A. Zinc-ion dependent protein in boar semen. II. Effects on sperm motility and antibacterial properties. *Anim. Reprod. Sci.*, v.13, p.133-142, 1987.

STRZEZEK, J.; SAIZ-CIDONCHA, F.; WYSOCKI, P. et al. Seminal plasma proteins as markers of biological value of boar semen. *Anim. Sci. Papers Rep.*, v.20, p.255-266, 2002.

SUZUKI, K.; ERIKSSON, B.; SHIMIZU, H. et al. Effect of hyaluronan on monospermic penetration of porcine oocytes fertilized in vitro. *International Journal of Andrology*, v.23, p.13-21, 2000.

TAMULI, M.K.; WATSON, P.F. Effect of temperature of incubation on the development of resistance to cold stress and hyposmotic stress in boar spermatozoa incubated for up to 24 hours. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 12, 1992,

Hague, Proc...Hague:1992, v.3, p.1484-1486.

TAMULI M.K.; WATSON, P.F. Cold resistance in the live acrosome-intact subpopulation of boar spermatozoa acquired during incubation after ejaculation. *J. Vet Rec*, v.135, p. 160-162, 1994.

TANTASUPARUK, W.; LUNDEHEIM, N.; DALIN, A.-M. et al. Reproductive performance of purebred landrace and yorkshire sows in Thailand with special reference to seasonal influence and parity number. *Theriogenology*, v.54, p.481-496, 2000.

TARDIF, S.; LAFOREST, J.P.; CORMIER, N. et al. The importance of porcine sperm parameters on fertility in vivo. *Theriogenology*, v.52, p.447-459, 1999.

TEMPLETON, A.A., COOPER, I.; KELLY, R.C. Prostaglandin concentration in the semen of fertile men. *J. Reprod. Fert.*, v.52, p.147-150, 1978.

THERIEN, I.; BLEAU, G.; MANJUNATH, P. Phosphatidylcholine-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin. *Biol. Reprod.*, v.52, p.1372-1379, 1995.

THERIEN, I.; SOUBEYRAND, S.; MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma modulate sperm capacitation by high-density lipoprotein. *Biol. Reprod.*, v.57, p.1080-1088, 1997.

TIENTHAI, P.; KJELLEN, L.; PERTOFT, H. et al. Localization and quantitation of hyaluronan and sulfated glycosaminoglycans in the tissues and intraluminal fluid of the pig oviduct. *Reprod. Fertil. Dev.*, v.12, p.173-182, 2000.

- TIENTHAI, P.; JOHANNISSON, A.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Sperm capacitation in the porcine oviduct. *Anim. Reprod. Sci.*, v.80, p.131-146, 2004.
- TILTON, J. E.; COLE, D.J.A. Effect of triple versus double mating on sow productivity. *Anim. Prod.*, v.34, p.279-282, 1982.
- TÖPFER-PETERSEN, E.; CALVETE, J.J. Sperm-associated protein candidates for primary zona pellucida-binding molecules: structure-function correlations of boar spermadhesins. *J. Reprod. Fertil.*, suppl. 50, p.55-61, 1996.
- TÖPFER-PETERSEN, E.; ROMERO, A.; VARELA, P.F. Spermadhesins: a new protein family: facts, hypotheses and perspectives. *Andrologia*, v. 30, p.217-224, 1998.
- TRAAS, A.M.; KUSTRITZ, M.V.R. Effect of administering oxytocin or prostaglandin F 2 $\alpha$  on characteristics of the canine ejaculate. *Can. Vet. Journ.*, v.45, p.999-1002, 2004.
- TROEDSSON, M.H.T.; DESVOUSGES, A.; ALGHAMDI, A.S. et al. Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. *Anim. Reprod. Sci.*, v.89, p.171-186, 2005.
- VADNAIS, M.L.; KIRKWOOD, R.N.; TEMPELMAN, R.J. et al. Effect of cooling and seminal plasma on the capacitation status of fresh boar sperm as determined using chlortetracycline assay. *Anim. Reprod. Sci.*, v.87, p.121-132, 2005.
- VADNAIS, M.L.; KENNETH, P.R. Effects of seminal plasma on coolong-induced capacitate changes in boar sperm. *J. Androl.*, v.28, p.416-422, 2007.
- VALENZUELA, C.A.W. Característica física e morfológica do sêmen, comportamento sexual e biometria testicular de varrões das raças Landrace e Yorkshire em atividade reprodutiva. 1982. 133p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte.
- VAN DER HOLST, W. De huidge em de toekomstige ontwikkelin van de K.I. bij paarden in Nederland. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, v.53, n.4, p.302-307, 1984.
- VAN DER LENDE, T. Embryonic and fetal mortality in swine: causes, consequences and how to prevent these losses. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO E INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM SUÍNOS, 7, 2000, Foz do Iguaçu, Anais... Foz do Iguaçu: 2000, p.243-252.
- VAN DER LENDE, T.; KNOL, E.F.; LEENHOUWERS, J.I. et al. Prenatal development as a predisposing factor for perinatal losses in pigs. *Reproduction*, suppl. v.58, p.247-261. 2001.
- VAN DER LENDE, T., VAN RENS, B.T.T.M. Critical periods for foetal mortality in gilts identified by analyzing the length distribution of mummified foetuses and frequency of non-fresh stillborn piglets. *Anim. Reprod. Sci.*, v.75, p.141-150, 2003.
- VARLEY, M.A.; FOXCROFT, G.R. Endocrinology of the lactating and weaned sow. *J Reprod Fertil.*, suppl., v.40, p.47-61, 1990.
- VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L.; LOVE, C.L. et al. Effects of semen fractionation and dilution ratio on equine spermatozoal motility

parameters. *Theriogenology*, v.28, n.5, p.709-723, 1987.

VÁZQUEZ, I.; MARTÍNEZ, F.; PIEDRABUENA, E. et al. Efecto de la cafeína en la constrastración del semen de verraco conservado a + 5°C. *Anaporc*, v.36, p.32-35, 1985.

VAZQUEZ, J.M.; MARTINEZ, E.A.; PARRILLA, I. ET AL. Birth of piglets after deep intrauterine insemination with flow cytometrically sorted boar spermatozoa. *Theriogenology*, v.59, p.1605-1614, 2003.

VENUMANOHARARAO, B.; VENKATAMUNICHETTY, A.; RAMACHANDRAIAH, S.V. et al. Preservation of native boar semen. *Indian J. Anim. Reprod.*, v.01, p.37-49, 1991.

VERSTEGEN J, IGUER-OUADA M, ONELIN K. Computer-assisted semen analysers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, v.57, p.149-79, 2002.

VESELSKÝ, L.; PEKNICOVÁ, J.; CECHOVÁ, D.; et al. Characterization of boar spermadhesins by monoclonal and polyclonal antibodies and their role in binding to oocytes. *Am. J. Reprod. Immunol.*, v.42, p.187-197, 1999.

VESSEUR, P.C.; KEMP, B.; DEN HARTOG, L.A. Factors affecting the weaning to estrus interval in the sow. *J. Anim. Phys. Anim. Nut.*, v.72, p.225-233, 1994.

VESSEUR, P.C. *Causes and consequences of variation in weaning to oestrus interval*. 1997. 166p. Ph.D Thesis. (Ph. D in Veterinary Medicine – Animal Reproduction) - Research Institute for Pig Husbandry, The Netherlands.

VIANA, C.H.C.; SILVEIRA, P.R.S.; MORETTI, A.S. et al. Relações entre as

características intervalo desmame-cio, duração do cio e momento da ovulação diagnosticado pela ultra-sonografia em fêmeas da espécie suína. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.36, n.4, 1999.

VIRING, S.; EINARSSON, S. Sperm distribution within the genital tract of naturally inseminated gilts. *Nord Vet Med*, v.33, p.145-9, 1981.

VISHWANATH, R.; SHANNON, P.; CURSON, B. Cationic extracts of egg yolk and their effects on motility, survival and fertilizing ability of bull sperm. *Anim Reprod Sci.*, v.29, p.185-194, 1992.

VOGLMAYR, J.K.; AMANN, R.P. Glucose metabolism and lipid synthesis of cauda epididymal and ejaculated bull spermatozoa in the presence of selected androgens. *Acta Endocrinol.*, v.73, p.196, 1973.

VYT, P.; MAES, D.; DEJONCKHEERE, E. et al. Comparative study on five different commercial extenders for boar semen. *Reprod. Dom. Anim.*, v.39, p.8-12, 2004.

VYT, P. *Examination and storage of liquid porcine semen*. 2007.162p. PhD Thesis ( Doctor in Veterinary Science) – Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University. Ghent.

WABERSKI, D.; WEITZE, K.F.; RATH, D. Effect of bovine serum albumin and zwitterionic buffers on stored liquid boar semen. *Zuchthygiene*, v.24, p.128-133, 1989.

WABERSKI, D.; MEDING, S.; DIRKSEN, G. et al. Fertility of long term stored boar semen: influence of extender (Androhep and Kiev), storage time and plasma droplets in the semen. *Anim. Reprod. Sci.*, v.36, p.145-151, 1994a.

- WABERSKI D, WEITZE KF, GLEUMES T, et al. Effect of time of insemination relative to ovulation on fertility with liquid and frozen boar semen. *Theriogenology*, v.42, p.831–840, 1994b.
- WABERSKI D, WEITZE KF, LIETMANN C. et al. The initial fertilizing capacity of longterm-stored liquid boar semen following pre- and postovulatory inseminations. *Theriogenology*, v.41, p.1367–1377, 1994c.
- WABERSKI, D.; CLASSEN, R.; HAHN, T. et al. LH profile and advancement of ovulation after transcervical infusion of seminal plasma at different stages of oestrus in gilts. *J. Reprod. Fertil.*, v.109, p.29–34, 1997.
- WANGGREN, K.; LALITKUMAR, P.G.; STAVREUS-EVERS, A. et al. Prostaglandin E2 and F2alpha receptors in the human Fallopian tube before and after mifepristone treatment. *Mol Hum Reprod.*, v.12, p.577–85, 2006.
- WATSON, P.F. The interaction of egg yolk and ram spermatozoa studied with a fluorescent probe. *J Reprod Fertil.*, v.42, p.105–111, 1975.
- WATSON, P.F.; PLUMMER, J.M. The response of boar sperm membranes to cold shock and cooling. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON DEEP FREEZING OF BOAR SEMEN 1, 1985, Uppsala, Proc... Uppsala: 1985, p.113-125.
- WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.*, v.7, 871-891, 1995.
- WATSON, P.F. Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. In: INTERNATIONAL CONFERENCE OF BOAR SEMEN PRESERVATION, 3, 1996, Mariensee. Proc... Blackwell, Berlin, 1996, v. 31, p.135-140.
- WATSON, P.F.; BEHAN, J.R. Intrauterine insemination of sows with reduced sperm numbers: results of a commercially based field trial. *Theriogenology*, v.57, p.1683-1693, 2002.
- WEBER, H. *Influence of dilution media, incubation and cooling rate on cold-shock sensitivity of boar spermatozoa*. 1989. 103p. PhD Thesis (Doctor in Veterinary Science) – School of Veterinary Medicine, Hannover University.
- WEITZE, K.F.; HABECK, O.; WILLMEN, T. et al. Detection of ovulation in the sows using transcutaneous sonography. *Reprod. Dom. Anim.*, v.24, p.40-42, 1989.
- WEITZE K.F. Long- term storage of extended boar semen. *Reprod Dom Anim Suppl 1*, p.23-253, 1990a.
- WEITZE, K.F. The use of “long-term extender” in pig AI-a view of the international situation. *Pig News and Information*, v.11, n1, p.23-26, 1990b.
- WEITZE, K.F.; RATH, D.; WILLMEN, T. et al. Advancement of ovulation in the sow related to seminal plasma application before insemination. *Reprod. Domest. Anim.*, v.25, p.61–67, 1990.
- WEITZE, K.F. Long-term storage of extended boar semen. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 11, 1991, Beltsville. Proc... Beltsville: p 231-253, 1991.
- WEITZE, K.F.; WAGNER-RIETSCHER, H.; WABERSKI, D. et al. The onset of heat after weaning, heat duration and ovulation

- as major factors in AI timing in sows. *Reprod. Domest. Anim.*, v.91, p.349-363, 1994.
- WILLEMSE, A.H.; BOENDER, J. A quantitative and qualitative analysis of oestrus in gilts. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde*, n.91, p.349-363, 1966.
- WILLMEN, T.; RABELER, J.; EVERWAND, A. et al. Influence of seminal plasma and oestrogens in the inseminate on fertilization rate, sperm transport, and ovulation time. *Reprod. Domest. Anim.*, suppl., v.26, p.379-83, 1991.
- WILSON, M.R.; FRIENDSHIP, R.M.; MACMILLAN I. et al. A survey of productivity and its component interrelationship in Canadian swine herds. *J. Anim. Sci.*, v.62, p.576-582, 1986.
- WILSON, M.R.; DEWEY, C.E. The associations between weaning-to-estrus interval and sow efficiency. *Sw. Heal. Prod.*, v.1, n.4, p.10-15, 1993.
- WINDSOR, D.P. Mitochondrial function and ram sperm fertility. *Reprod Fertil Dev.*, v.9, p.279-284, 1997.
- WOELDERS, H. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BOAR SEMEN PRESERVATION, 1991, p.145-165.
- XU, X.; DING, J.; SETH, P.C. et al. In vitro fertilization of in vitro matured pig oocytes: Effects of boar and ejaculate fraction. *Theriogenology*, v.45, p.745-755, 1996.
- XU, X.; POMMIER, S.; ARBOV, T. et al. In vitro maturation and fertilization techniques for assessment of semen quality and boar fertility. *J. Anim. Sci.*, v.76, p.3079-3089, 1998.
- XUE J.L.; LUCIA, T., KOKETSU, Y. et al. Effect of mating frequency and weaning-to-mating interval on sow reproductive performance. *Swi. Healt. Prod.*, v.6, n.4, p.157-162, 1998a.
- XUE, J.; DIAL, G.D.; TRIGG, T. et al. Influence of Mating Frequency on Sow Reproductive Performance. *J Anim Sci*, v.76, p.2962-2966, 1998b.
- YANAGIMACHI, R. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote*, v.2, p.371-372, 1994.
- YANG, W.C.; KWOK, S.C.M.; LESHIN, S. et al. Purified porcine seminal plasma protein enhances in vitro immune activities of porcine peripheral lymphocytes. *Biol. Reprod.*, v.59, p.202-207, 1998.
- YESTE, M.; BRIZ, M.; PINART, E. et al. Boar spermatozoa and prostaglandin F2 $\alpha$ : Quality of boar sperm after the addition of prostaglandin F2 $\alpha$  to the short-term extender over cooling time. *Anim. Reprod. Sci.*, v.108, p.180-195, 2008a.
- YESTE, M.; BRIZ, M.; PINART, E. et al. Hyaluronic acid delays boar sperm capacitation after 3 days of storage at 15 degrees C. *Anim Reprod Sci.*, v.109, p. 236-250, 2008b.
- YEUNG, C.H., SONNENBERG-RIETHMACHER, E.; COOPER, T.G. Infertile spermatozoa of c-ros tyrosine kinase receptor knockout mice show flagellar angulation and maturational defects in cell volume regulatory mechanisms. *Biol Reprod.*, v.61, p.1062-1069, 1999.
- ZEUNER, A. On the relations between sperm morphology and the fertility of boar semen. In: *Int. Congr. Anim. Reprod.*, 12, 1992, The Hague, The Netherlands 3, 1992, p.1617-1619.

ZHU, J.; XU, X.; COSGROVE, R.; et al. Effects of seminal plasma from different fractions of individual ejaculates on IVF in pigs. *Theriogenology*, v.54, p.1443-1452, 2000.

ZINI, A.; DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Reactive oxygen species in semen of infertile patients: level of superoxide dismutase and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. *Inter. J. Androl.*, v.16, p.183-188, 1993.

## 8. ANEXOS

### I. Análises estatísticas referentes ao Experimento I

#### Ia – Análises estatísticas referentes à tabela 13

Análise 1: Comparação do volume de sêmen entre as frações 1 e 2

Tratamento	n	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Variância	T	DF	Prob> [T]
F1	10	15,00	0,000	0,000	Desigual	-16,836	9,0	0,000
F2	10	208,98	3,644	1,152	Igual	-16,836	18,0	0,000

Todos os valores são os mesmos para um nível de classe.

Análise 2: Comparação da motilidade espermática entre as frações 1 e 2 ( $\arcsen\sqrt{\%}$ )

Tratamento	n	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Variância	T	DF	Prob> [T]
F1	10	1,04	0,043	0,013	Desigual	0,000	18,0	1,000
F2	10	1,04	0,043	0,013	Igual	0,000	18,0	1,000

Para H0: Variâncias são iguais,  $F' = 1,00$       DF = 9,9      Prob>F' = 1,0000

Análise 3: Comparação do vigor espermático entre as frações 1 e 2

Tratamento	n	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Variância	T	DF	Prob> [T]
F1	10	4,70	0,350	0,111	Desigual	2,309	17,4	0,033
F2	10	4,30	0,422	0,133	Igual	2,309	18,0	0,033

Para H0: Variâncias são iguais,  $F' = 1,45$       DF = 9,9      Prob>F' = 0,5857

Análise 4: Comparação do número de espermatozóides por mL entre as frações 1 e 2

Tratamento	n	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Variância	T	DF	Prob> [T]
F1	10	1692,00	584,861	184,949	Desigual	7,739	9,4	0,000
F2	10	246,00	83,925	26,539	Igual	7,739	18,0	0,000

Para H0: Variâncias são iguais,  $F' = 48,57$       DF = 9,9      Prob>F' = 0,0000

Análise 5: Comparação do número de espermatozóides móveis/mL entre as frações 1 e 2

Tratamento	n	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Variância	T	DF	Prob> [T]
F1	10	1271,60	470,797	148,879	Desigual	7,211	9,4	0,000
F2	10	185,56	72,129	22,809	Igual	7,211	18,0	0,000

Para H0: Variâncias são iguais,  $F' = 42,68$       DF = 9,9      Prob>F' = 0,0000

Análise 6: Comparação do número de espermatozóides totais entre as frações 1 e 2

Tratamento	n	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Variância	T	DF	Prob> [T]
F1	10	25,38	8,773	2,774	Desigual	-4,761	15,4	0,000
F2	10	49,72	13,581	4,295	Igual	-4,761	18,0	0,000

Para H0: Variâncias são iguais,  $F' = 2,40$       DF = 9,9      Prob>F' = 0,2090

Análise 7: Comparação do número total de espermatozóides móveis entre as frações 1 e 2

Tratamento	n	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Variância	T	DF	Prob> [T]
F1	10	19,08	7,070	2,236	Desigual	-4,160	14,6	0,001
F2	10	37,38	11,981	3,789	Igual	-4,160	18,0	0,001

Para H0: Variâncias são iguais,  $F' = 2,87$       DF = 9,9      Prob>F' = 0,1319

Análise 8: Comparação do volume de sêmen utilizado por dose inseminante, entre as frações 1 e 2

Tratamento	n	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Variância	T	DF	Prob> [T]
F1	10	2,76	1,321	0,418	Desigual	-7,682	9,8	0,000
F2	10	18,22	6,225	1,969	Igual	-7,682	18,0	0,000
Para H0: Variâncias são iguais, F' = 22,21					DF = 9,9	Prob>F' = 0,0000		

Análise 9: Comparação do volume de diluidor utilizado por dose inseminante entre as frações 1 e 2

Tratamento	n	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Variância	T	DF	Prob> [T]
F1	10	97,24	1,321	0,418	Desigual	7,681	9,8	0,000
F2	10	81,78	6,225	1,969	Igual	7,681	18,0	0,000
Para H0: Variâncias são iguais, F' = 22,20					DF = 9,9	Prob>F' = 0,0000		

Análise 10: Comparação do número potencial de porcas inseminadas entre as frações 1 e 2

Tratamento	n	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Variância	T	DF	Prob> [T]
F1	10	6,36	2,359	0,746	Desigual	-4,156	14,6	0,001
F2	10	12,45	3,987	1,261	Igual	-4,156	18,0	0,001
Para H0: Variâncias são iguais, F' = 2,86					DF = 9,9	Prob>F' = 0,1337		

Análise 11: Comparação do tempo da colheita à diluição do sêmen entre as frações 1 e 2

Tratamento	n	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Variância	T	DF	Prob> [T]
F1	10	16,50	3,028	0,957	Desigual	-0,225	15,3	0,825
F2	10	16,90	4,748	1,501	Igual	-0,225	18,0	0,825
Para H0: Variâncias são iguais, F' = 2,46					DF = 9,9	Prob>F' = 0,1962		

Análise 12: Comparação do tempo da colheita ao resfriamento do sêmen entre as frações 1 e 2

Tratamento	n	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Variância	T	DF	Prob> [T]
F1	10	45,50	8,017	2,535	Desigual	2,335	17,9	0,031
F2	10	37,40	7,486	2,367	Igual	2,335	18,0	0,031
Para H0: Variâncias são iguais, F' = 1,15					DF = 9,9	Prob>F' = 0,8416		

## Ib – Análises estatísticas referentes à tabela 17

Análise 13: Efeito da fração do ejaculado, do protocolo de resfriamento e do tempo de estocagem, bem como de suas interações sobre a motilidade espermática (arcsen √%)

FV	Análise de Variância				
	GL	SQ	QM	F	P
Total	239	9,156			
Diluidor	1	1,045	1,045	116,67	0,000
Fração	1	2,162	2,162	241,48	0,000
Tempo	5	2,895	0,579	64,66	0,000
Diluidor x Fração	1	0,000	0,000	0,00	0,100
Diluidor x Tempo	5	0,256	0,051	5,73	0,000
Fração x Tempo	5	0,862	0,172	19,24	0,000
Diluidor x Fração x Tempo	5	0,002	0,000	0,04	0,999
Modelo	23	7,222	0,314	35,06	0,000
Erro	216	1,934	0,009		
CV		11,093			

Análise 14: Comparação da motilidade espermática entre os tratamentos, às zero horas de estocagem

Teste de kruskal-Wallis	
Tratamentos	Valor
F1T1 x F1T2	0,1844
F1T1 x F2T1	0,1097
F1T1 x F2T2	0,0069
F1T2 x F2T1	0,7839
F1T2 x F2T2	0,1643
F2T1 x F2T2	0,2635

Análise 15: Comparação da motilidade espermática entre os tratamentos, às 12 horas de estocagem

Teste de kruskal-Wallis	
Tratamentos	Valor
F1T1 x F1T2	0,1438
F1T1 x F2T1	0,0675
F1T1 x F2T2	0,0005
F1T2 x F2T1	0,7115
F1T2 x F2T2	0,0399
F2T1 x F2T2	0,0912

Análise 16: Comparação da motilidade espermática entre os tratamentos, às 24 horas de estocagem

Teste de kruskal-Wallis	
Tratamentos	Valor
F1T1 x F1T2	0,0167
F1T1 x F2T1	0,0058
F1T1 x F2T2	0,0001
F1T2 x F2T1	0,7082
F1T2 x F2T2	0,0111
F2T1 x F2T2	0,0299

Análise 17: Comparação da motilidade espermática entre os tratamentos, às 36 horas de estocagem

Teste de kruskal-Wallis	
Tratamentos	Valor
F1T1 x F1T2	0,0006
F1T1 x F2T1	0,0001
F1T1 x F2T2	0,0001
F1T2 x F2T1	0,3964
F1T2 x F2T2	0,0001
F2T1 x F2T2	0,0004

Análise 18: Comparação da motilidade espermática entre os tratamentos, às 48 horas de estocagem

Teste de kruskal-Wallis

Tratamentos	Valor
F1T1 x F1T2	0,0001
F1T1 x F2T1	0,0001
F1T1 x F2T2	0,0001
F1T2 x F2T1	0,0123
F1T2 x F2T2	0,0001
F2T1 x F2T2	0,0001

Análise 19: Comparação da motilidade espermática entre os tratamentos, às 72 horas de estocagem

Teste de kruskal-Wallis

Tratamentos	Valor
F1T1 x F1T2	0,0001
F1T1 x F2T1	0,0001
F1T1 x F2T2	0,0001
F1T2 x F2T1	0,0002
F1T2 x F2T2	0,0001
F2T1 x F2T2	0,0001

Análise 20: Comparação da motilidade espermática no tratamento F1T1, entre os diferentes tempos de armazenamento

Teste de kruskal-Wallis

Tempos	Valor
0 x 12	0,7133
0 x 24	0,2847
0 x 36	0,0001
0 x 48	0,0001
0 x 72	0,0001
12 x 24	0,1512
12 x 36	0,0001
12 x 48	0,0001
12 x 72	0,0001
24 x 36	0,0009
24 x 48	0,0001
24 x 72	0,0001
36 x 48	0,0001
36 x 72	0,0001
48 x 72	0,0003

Análise 21: Comparação da motilidade espermática no tratamento F1T2, entre os diferentes tempos de armazenamento  
 Teste de kruskal-Wallis

Tempos	Valor
0 x 12	0,6153
0 x 24	0,9928
0 x 36	0,0230
0 x 48	0,0001
0 x 72	0,0001
12 x 24	0,6216
12 x 36	0,0057
12 x 48	0,0001
12 x 72	0,0001
24 x 36	0,0225
24 x 48	0,0001
24 x 72	0,0001
36 x 48	0,0045
36 x 72	0,0001
48 x 72	0,0010

Análise 22: Comparação da motilidade espermática no tratamento F2T1, entre os diferentes tempos de armazenamento  
 Teste de kruskal-Wallis

Tempos	Valor
0 x 12	0,5498
0 x 24	0,9132
0 x 36	0,0879
0 x 48	0,0040
0 x 72	0,0001
12 x 24	0,6247
12 x 36	0,0217
12 x 48	0,0005
12 x 72	0,0001
24 x 36	0,0696
24 x 48	0,0028
24 x 72	0,0001
36 x 48	0,2331
36 x 72	0,0014
48 x 72	0,0432

Análise 23: Comparação da motilidade espermática no tratamento F2T2, entre os diferentes tempos de armazenamento

Teste de kruskal-Wallis	
Tempos	Valor
0 x 12	0,2414
0 x 24	0,2414
0 x 36	0,4376
0 x 48	0,6085
0 x 72	0,6063
12 x 24	1,0000
12 x 36	0,6918
12 x 48	0,5089
12 x 72	0,0923
24 x 36	0,6918
24 x 48	0,5089
24 x 72	0,0923
36 x 48	0,7915
36 x 72	0,1971
48 x 72	0,3046

Análise 24: Comparação do vigor espermático entre os tratamentos, às zero horas de estocagem

Teste de kruskal-Wallis	
Tratamentos	Valor
F1T1 x F1T2	0,0267
F1T1 x F2T1	0,1730
F1T1 x F2T2	0,0028
F1T2 x F2T1	0,4035
F1T2 x F2T2	0,0620
F2T1 x F2T2	0,0240

Análise 25: Comparação do vigor espermático entre os tratamentos, às 12 horas de estocagem

Teste de kruskal-Wallis	
Tratamentos	Valor
F1T1 x F1T2	0,1670
F1T1 x F2T1	0,0148
F1T1 x F2T2	0,0005
F1T2 x F2T1	0,4515
F1T2 x F2T2	0,0077
F2T1 x F2T2	0,0151

Análise 26: Comparação do vigor espermático entre os tratamentos, às 24 horas de estocagem

Teste de kruskal-Wallis	
Tratamentos	Valor
F1T1 x F1T2	0,0575
F1T1 x F2T1	0,0852
F1T1 x F2T2	0,0006
F1T2 x F2T1	0,8703
F1T2 x F2T2	0,0077
F2T1 x F2T2	0,0076

Análise 27: Comparação do vigor espermático entre os tratamentos, às 36 horas de estocagem

Teste de kruskal-Wallis	
Tratamentos	Valor
F1T1 x F1T2	0,0329
F1T1 x F2T1	0,0120
F1T1 x F2T2	0,0001
F1T2 x F2T1	0,6095
F1T2 x F2T2	0,0010
F2T1 x F2T2	0,0035

Análise 28: Comparação do vigor espermático entre os tratamentos, às 48 horas de estocagem

Teste de kruskal-Wallis	
Tratamentos	Valor
F1T1 x F1T2	0,0114
F1T1 x F2T1	0,0012
F1T1 x F2T2	0,0001
F1T2 x F2T1	0,5217
F1T2 x F2T2	0,0003
F2T1 x F2T2	0,0013

Análise 29: Comparação do vigor espermático entre os tratamentos, às 72 horas de estocagem

Teste de kruskal-Wallis	
Tratamentos	Valor
F1T1 x F1T2	0,0035
F1T1 x F2T1	0,0010
F1T1 x F2T2	0,0001
F1T2 x F2T1	0,3796
F1T2 x F2T2	0,0006
F2T1 x F2T2	0,0023

Análise 30: Comparação do vigor espermático no tratamento F1T1, entre os diferentes tempos de armazenamento

Teste de kruskal-Wallis	
Tempos	Valor
0 x 12	0,4907
0 x 24	0,1129
0 x 36	0,0014
0 x 48	0,0002
0 x 72	0,0001
12 x 24	0,2136
12 x 36	0,0027
12 x 48	0,0002
12 x 72	0,0001
24 x 36	0,1257
24 x 48	0,0032
24 x 72	0,0004
36 x 48	0,0253
36 x 72	0,0011
48 x 72	0,0501

Análise 31: Comparação do vigor espermático no tratamento F1T2, entre os diferentes tempos de armazenamento

Teste de kruskal-Wallis	
Tempos	Valor
0 x 12	0,5345
0 x 24	0,5345
0 x 36	0,0054
0 x 48	0,0004
0 x 72	0,0001
12 x 24	1,0000
12 x 36	0,0849
12 x 48	0,0104
12 x 72	0,0015
24 x 36	0,0849
24 x 48	0,0104
24 x 72	0,0015
36 x 48	0,2361
36 x 72	0,0220
48 x 72	0,2029

Análise 32: Comparação do vigor espermático no tratamento F2T1, entre os diferentes tempos de armazenamento

Teste de kruskal-Wallis	
Tempos	Valor
0 x 12	0,3616
0 x 24	0,8089
0 x 36	0,1334
0 x 48	0,0095
0 x 72	0,0011
12 x 24	0,3583
12 x 36	0,0317
12 x 48	0,0028
12 x 72	0,0004
24 x 36	0,3059
24 x 48	0,0561
24 x 72	0,0078
36 x 48	0,2676
36 x 72	0,0382
48 x 72	0,2273

Análise 33: Comparação do vigor espermático no tratamento F2T2, entre os diferentes tempos de armazenamento

Teste de kruskal-Wallis	
Tempos	Valor
0 x 12	0,7879
0 x 24	0,7879
0 x 36	0,7372
0 x 48	0,1095
0 x 72	0,0098
12 x 24	1,0000
12 x 36	0,4531
12 x 48	0,0147
12 x 72	0,0015
24 x 36	0,4531
24 x 48	0,0147
24 x 72	0,0015
36 x 48	0,1647
36 x 72	0,0125
48 x 72	0,0839

**Ic – Análises estatísticas referentes à tabela 18**

Análise 34: Comparação da percentagem de espermatozóides normais entre as frações 1 e 2 no sêmen fresco (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fração	n	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Variância	T	DF	Prob> [T]
1	10	1,23	0,07	0,02	Desigual	1,0596	15,8	0,3053
2	10	1,20	0,05	0,01	Igual	1,0596	18,0	0,3034

Para H0: Variâncias são iguais, F' = 2,21      DF = 9, 9      Prob>F' = 0,2520

Análise 35: Comparação da percentagem de espermatozóides normais entre os tratamentos no tempo 0 horas (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	P
Total	39	0,2578			
Modelo	3	0,1317	0,0439	12,53	0,0001
Erro	36	0,1261	0,0035		

Coefficiente de Variação: 4,9741

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste			
	F1T1	F1T2	F2T1	F2T2
SNK (P<0,05)	b	a	b	a

Análise 36: Comparação da percentagem de espermatozóides normais entre os tratamentos no tempo 12 horas (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	P
Total	39	0,2025			
Modelo	3	0,0544	0,0181	4,40	0,0097
Erro	36	0,1482	0,0041		

Coefficiente de Variação: 5,4809

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste			
	F1T1	F1T2	F2T1	F2T2
SNK (P<0,05)	b	a	b	ab

Análise 37: Comparação da percentagem de espermatozóides normais entre os tratamentos no tempo 24 horas (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	P
Total	39	0,1533			
Modelo	3	0,0375	0,0125	3,88	0,0167
Erro	36	0,1159	0,0032		

Coefficiente de Variação: 4,9586

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste			
	F1T1	F1T2	F2T1	F2T2
SNK (P<0,05)	b	a	b	ab

Análise 38: Comparação da percentagem de espermatozóides normais entre os tratamentos no tempo 36 horas (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	P
Total	39	0,1607			
Modelo	3	0,0138	0,0046	1,12	0,3523
Erro	36	0,1469	0,0040		

Coefficiente de Variação: 5,6480

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste			
	F1T1	F1T2	F2T1	F2T2
SNK	a	a	a	a

Análise 39: Comparação da percentagem de espermatozóides normais entre os tratamentos no tempo 48 horas (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	P
Total	39	0,1640			
Modelo	3	0,0242	0,0080	2,07	0,1207
Erro	36	0,1398	0,0039		

Coefficiente de Variação: 5,5754

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste			
	F1T1	F1T2	F2T1	F2T2
SNK (P<0,05)	a	a	a	a

Análise 40: Comparação da percentagem de espermatozóides normais entre os tratamentos no tempo 72 horas (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	P
Total	39	0,2399			
Modelo	3	0,0165	0,0055	0,89	0,4579
Erro	36	0,2235	0,0062		

Coefficiente de Variação: 7,1403

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste			
	F1T1	F1T2	F2T1	F2T2
SNK (P<0,05)	a	a	a	a

Análise 41: Comparação da percentagem de espermatozóides normais nos diferentes tempos para o tratamento F1T1 (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F	P
Total	69	0,3837			
Modelo	6	0,1323	0,0220	5,53	0,0001
Erro	63	0,2514	0,0040		

Coefficiente de variação: 5,5919

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste						
	fresco	0h	12h	24h	36h	48h	72h
SNK (P<0,05)	A	B	B	B	B	B	B

Análise 42: Comparação da percentagem de espermatozóides normais nos diferentes tempos para o tratamento F1T2 (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F	P
Total	69	0,2910			
Modelo	6	0,1188	0,0198	7,24	0,0001
Erro	63	0,1722	0,0027		

Coefficiente de variação: 4,3996

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste						
	fresco	0h	12h	24h	36h	48h	72h
SNK (P<0,05)	A	A	AB	ABC	BCD	CD	D

Análise 43: Comparação da percentagem de espermatozóides normais nos diferentes tempos para o tratamento F2T1 (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F	P
Total	69	0,4678			
Modelo	6	0,1032	0,0172	2,97	0,0128
Erro	63	0,3646	0,0058		

Coefficiente de variação: 6,7500

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste						
	fresco	0h	12h	24h	36h	48h	72h
SNK (P<0,05)	A	AB	AB	AB	AB	B	B

Análise 44: Comparação da percentagem de espermatozóides normais nos diferentes tempos para o tratamento F2T2 (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F	P
Total	69	0,3775			
Modelo	6	0,1448	0,0241	6,53	0,0001
Erro	63	0,2327	0,0037		

Coefficiente de variação: 5,1993

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste						
	fresco	0h	12h	24h	36h	48h	72h
SNK (P<0,05)	AB	A	ABC	BC	BC	BC	C

## Id – Análises estatísticas referentes à tabela 19

Análise 45: Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de cabeça entre as frações 1 e 2 no sêmen fresco (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fração	n	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Variância	T	DF	Prob> [T]
1	10	0,08	0,05	0,01	Desigual	-1,8117	16,5	0,0882
2	10	0,13	0,06	0,02	Igual	-1,8117	18,0	0,0868

Para H0: Variâncias são iguais, F' = 1,84      DF = 9, 9      Prob>F' = 0,3766

Análise 46: Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de cabeça entre os tratamentos no tempo 0 horas (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	P
Total	39	0,0668			
Modelo	3	0,0174	0,0058	4,22	0,0118
Erro	36	0,0494	0,0014		

Coefficiente de Variação: 27,4292

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste			
	F1T1	F1T2	F2T1	F2T2
SNK (P<0,05)	b	ab	ab	a

Análise 47: Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de cabeça entre os tratamentos no tempo de 12 horas (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	P
Total	39	0,1958			
Modelo	3	0,0090	0,0030	0,58	0,6312
Erro	36	0,1868	0,0052		

Coefficiente de Variação: 56,3518

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste			
	F1T1	F1T2	F2T1	F2T2
SNK (P<0,05)	a	a	a	a

Análise 48: Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de cabeça entre os tratamentos no tempo de 24 horas (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	P
Total	39	0,1908			
Modelo	3	0,0105	0,0035	0,70	0,5570
Erro	36	0,1803	0,0050		

Coefficiente de Variação: 54,2936

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste			
	F1T1	F1T2	F2T1	F2T2
SNK (P<0,05)	a	a	a	a

Análise 49: Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de cabeça entre os tratamentos no tempo de 36 horas (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	P
Total	39	0,1280			
Modelo	3	0,0072	0,0024	0,72	0,5492
Erro	36	0,1208	0,0033		

Coefficiente de Variação: 38,7254

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste			
	F1T1	F1T2	F2T1	F2T2
SNK (P<0,05)	a	a	a	a

Análise 50: Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de cabeça entre os tratamentos no tempo de 48 horas (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	P
Total	39	0,1281			
Modelo	3	0,0034	0,0011	0,33	0,8029
Erro	36	0,1247	0,0035		

Coefficiente de Variação: 39,5946

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste			
	F1T1	F1T2	F2T1	F2T2
SNK (P<0,05)	a	a	a	a

Análise 51: Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de cabeça entre os tratamentos no tempo de 72 horas (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	P
Total	39	0,1562			
Modelo	3	0,0108	0,0036	0,89	0,4533
Erro	36	0,1453	0,0040		

Coefficiente de Variação: 40,5903

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste			
	F1T1	F1T2	F2T1	F2T2
SNK (P<0,05)	a	a	a	a

Análise 52: Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de cabeça nos diferentes tempos para o tratamento F1T1 (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F	P
Total	69	0,2556			
Modelo	6	0,0673	0,0112	3,75	0,0029
Erro	63	0,1883	0,0030		

Coefficiente de variação: 39,1630

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste						
	fresco	0h	12h	24h	36h	48h	72h
SNK (P<0,05)	C	BC	ABC	ABC	AB	AB	A

Análise 53: Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de cabeça nos diferentes tempos para o tratamento F1T2 (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F	P
Total	69	0,2815			
Modelo	6	0,0242	0,0040	0,99	0,4405
Erro	63	0,2573	0,0041		

Coefficiente de variação: 50,4406

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste						
	fresco	0h	12h	24h	36h	48h	72h
SNK (P<0,05)	A	A	A	A	A	A	A

Análise 54: Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de cabeça nos diferentes tempos para o tratamento F2T1 (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F	P
Total	69	0,2894			
Modelo	6	0,0264	0,0044	1,06	0,3987
Erro	63	0,2629	0,0042		

Coefficiente de variação: 45,4781

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste						
	fresco	0h	12h	24h	36h	48h	72h
SNK (P<0,05)	A	A	A	A	A	A	A

Análise 55: Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de cabeça nos diferentes tempos para o tratamento F2T2 (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F	P
Total	69	0,2283			
Modelo	6	0,0198	0,0033	1,00	0,4349
Erro	63	0,2085	0,0033		

Coefficiente de variação: 41,9271

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste						
	fresco	0h	12h	24h	36h	48h	72h
SNK (P<0,05)	A	A	A	A	A	A	A

## Ie – Análises estatísticas referentes à tabela 20

Análise 56: Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de peça intermediária entre as frações 1 e 2 no sêmen fresco (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fração	n	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Variância	T	DF	Prob> [T]
1	10	0,12	0,07	0,02	Desigual	-0,3506	17,3	0,7302
2	10	0,13	0,06	0,02	Igual	-0,3506	18,0	0,7300

Para H0: Variâncias são iguais, F' = 1,50      DF = 9, 9      Prob>F' = 0,5531

Análise 57: Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de peça intermediária entre os tratamentos no tempo de 0 horas (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	P
Total	39	0,2267			
Modelo	3	0,0109	0,0036	0,61	0,6153
Erro	36	0,2158	0,0060		

Coefficiente de Variação: 61,0418

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste			
	F1T1	F1T2	F2T1	F2T2
SNK (P<0,05)	a	a	a	a

Análise 58: Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de peça intermediária entre os tratamentos no tempo de 12 horas (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	P
Total	39	0,1772			
Modelo	3	0,0147	0,0049	1,08	0,3684
Erro	36	0,1625	0,0045		

Coefficiente de Variação: 46,4787

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste			
	F1T1	F1T2	F2T1	F2T2
SNK (P<0,05)	a	a	a	a

Análise 59: Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de peça intermediária entre os tratamentos no tempo de 24 horas (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	P
Total	39	0,2136			
Modelo	3	0,0303	0,0100	1,98	0,1342
Erro	36	0,1833	0,0050		

Coefficiente de Variação: 48,0628

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste			
	F1T1	F1T2	F2T1	F2T2
SNK (P<0,05)	a	a	a	a

Análise 60: Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de peça intermediária entre os tratamentos no tempo de 36 horas (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	P
Total	39	0,2535			
Modelo	3	0,0343	0,0115	1,88	0,1502
Erro	36	0,2192	0,0060		

Coefficiente de Variação: 49,8776

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste			
	F1T1	F1T2	F2T1	F2T2
SNK (P<0,05)	a	a	a	a

Análise 61: Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de peça intermediária entre os tratamentos no tempo de 48 horas (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	P
Total	39	0,2507			
Modelo	3	0,0159	0,0053	0,81	0,4957
Erro	36	0,2348	0,0065		

Coefficiente de Variação: 46,3132

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste			
	F1T1	F1T2	F2T1	F2T2
SNK (P<0,05)	a	a	a	a

Análise 62: Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de peça intermediária entre os tratamentos no tempo de 72 horas (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	P
Total	39	0,2196			
Modelo	3	0,0020	0,0007	0,11	0,9525
Erro	36	0,2176	0,0060		

Coefficiente de Variação: 45,9712

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste			
	F1T1	F1T2	F2T1	F2T2
SNK (P<0,05)	a	a	a	a

Análise 63: Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de peça intermediária nos diferentes tempos para o tratamento F1T1 (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F	P
Total	69	0,3098			
Modelo	6	0,0432	0,0072	1,70	0,1356
Erro	63	0,2666	0,0042		

Coefficiente de variação: 39,5179

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste						
	fresco	0h	12h	24h	36h	48h	72h
SNK (P<0,05)	A	A	A	A	A	A	A

Análise 64: Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de peça intermediária nos diferentes tempos para o tratamento F1T2 (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F	P
Total	69	0,4063			
Modelo	6	0,0340	0,0057	0,96	0,4600
Erro	63	0,3723	0,0059		

Coefficiente de variação: 50,4646

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste						
	fresco	0h	12h	24h	36h	48h	72h
SNK (P<0,05)	A	A	A	A	A	A	A

Análise 65: Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de peça intermediária nos diferentes tempos para o tratamento F2T1 (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F	P
Total	69	0,4500			
Modelo	6	0,0297	0,0049	0,74	0,6183
Erro	63	0,4203	0,0067		

Coefficiente de variação: 61,2483

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste						
	fresco	0h	12h	24h	36h	48h	72h
SNK (P<0,05)	A	A	A	A	A	A	A

Análise 66: Comparação da percentagem de espermatozoides apresentando defeito de peça intermediária nos diferentes tempos para o tratamento F2T2 (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F	P
Total	69	0,3894			
Modelo	6	0,0545	0,0090	1,71	0,1334
Erro	63	0,3349	0,0053		

Coefficiente de variação: 49,6741

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste						
	fresco	0h	12h	24h	36h	48h	72h
SNK (P<0,05)	A	A	A	A	A	A	A

### If – Análises estatísticas referentes à tabela 21

Análise 67: Comparação da percentagem de espermatozoides apresentando defeito de cauda entre as frações 1 e 2 no sêmen fresco (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fração	n	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Variância	T	DF	Prob> [T]
1	10	0,19	0,09	0,03	Desigual	-2,0750	17,4	0,0531
2	10	0,27	0,07	0,02	Igual	-2,0750	18,0	0,0526

Para H0: Variâncias são iguais, F' = 1,44      DF = 9, 9      Prob>F' = 0,5948

Análise 68: Comparação da percentagem de espermatozoides apresentando defeito de cauda entre os tratamentos no tempo de 0 horas (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	P
Total	39	0,4336			
Modelo	3	0,2809	0,0936	22,06	0,0001
Erro	36	0,1528	0,0042		

Coefficiente de Variação: 26,2668

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste			
	F1T1	F1T2	F2T1	F2T2
SNK (P<0,05)	a	b	a	b

Análise 69: Comparação da percentagem de espermatozoides apresentando defeito de cauda entre os tratamentos no tempo de 12 horas (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	P
Total	39	0,4433			
Modelo	3	0,1010	0,0337	3,54	0,0241
Erro	36	0,3423	0,0095		

Coefficiente de Variação: 37,4070

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste			
	F1T1	F1T2	F2T1	F2T2
SNK (P<0,05)	ab	b	a	ab

Análise 70: Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de cauda entre os tratamentos no tempo de 24 horas (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	P
Total	39	0,4883			
Modelo	3	0,1572	0,0524	5,70	0,0027
Erro	36	0,3311	0,0092		

Coefficiente de Variação: 34,1032

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste			
	F1T1	F1T2	F2T1	F2T2
SNK (P<0,05)	a	b	a	a

Análise 71: Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de cauda entre os tratamentos no tempo de 36 horas (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	P
Total	39	0,3498			
Modelo	3	0,0410	0,0137	1,59	0,2078
Erro	36	0,3088	0,0086		

Coefficiente de Variação: 33,5237

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste			
	F1T1	F1T2	F2T1	F2T2
SNK (P<0,05)	a	a	a	a

Análise 72: Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de cauda entre os tratamentos no tempo de 48 horas (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	P
Total	39	0,5177			
Modelo	3	0,1129	0,0377	3,35	0,0297
Erro	36	0,4049	0,0112		

Coefficiente de Variação: 37,3364

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste			
	F1T1	F1T2	F2T1	F2T2
SNK (P<0,05)	ab	b	a	b

Análise 73: Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de cauda entre os tratamentos no tempo de 72 horas (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	P
Total	39	0,4680			
Modelo	3	0,0994	0,0331	3,24	0,0334
Erro	36	0,3686	0,0102		

Coefficiente de Variação: 35,4706

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste			
	F1T1	F1T2	F2T1	F2T2
SNK (P<0,05)	ab	ab	a	b

Análise 74: Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de cauda nos diferentes tempos para o tratamento FIT1 (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F	P
Total	69	0,4911			
Modelo	6	0,1037	0,0173	2,81	0,0173
Erro	63	0,3874	0,0061		

Coefficiente de variação: 27,7761

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste						
	fresco	0h	12h	24h	36h	48h	72h
SNK (P<0,05)	B	A	A	A	A	A	A

Análise 75: Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de cauda nos diferentes tempos para o tratamento FIT2 (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F	P
Total	69	0,4791			
Modelo	6	0,0788	0,0131	2,07	0,0697
Erro	63	0,4003	0,0064		

Coefficiente de variação: 38,1150

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste						
	fresco	0h	12h	24h	36h	48h	72h
SNK (P<0,05)	A	A	A	A	A	A	A

Análise 76: Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de cauda nos diferentes tempos para o tratamento F2T1 (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F	P
Total	69	0,8547			
Modelo	6	0,0655	0,0109	0,87	0,5211
Erro	63	0,7892	0,0125		

Coefficiente de variação: 33,4921

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste						
	fresco	0h	12h	24h	36h	48h	72h
SNK (P<0,05)	A	A	A	A	A	A	A

Análise 77: Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de cauda nos diferentes tempos para o tratamento F2T2 (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F	P
Total	69	0,6516			
Modelo	6	0,0898	0,0150	1,68	0,1409
Erro	63	0,5618	0,0089		

Coefficiente de variação: 39,2402

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste						
	fresco	0h	12h	24h	36h	48h	72h
SNK (P<0,05)	A	A	A	A	A	A	A

## Ig – Análises estatísticas referentes à tabela 22

Análise 78: Comparação da porcentagem de espermatozoides apresentando defeito de acrossoma entre as frações 1 e 2 no sêmen fresco (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fração	n	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Variância	T	DF	Prob> [T]
1	10	0,01	0,03	0,01	Desigual	0,0000	18,0	1,0000
2	10	0,01	0,03	0,01	Igual	0,0000	18,0	1,0000

Para H0: Variâncias são iguais, F' = 1,00      DF = 9, 9      Prob>F' = 1,0000

Análise 79: Comparação da porcentagem de espermatozoides apresentando defeito de acrossoma entre os tratamentos no tempo de 0 horas (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	P
Total	39	0,1260			
Modelo	3	0,0344	0,0115	4,50	0,0088
Erro	36	0,0916	0,0025		

Coefficiente de Variação: 150,2799

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste			
	F1T1	F1T2	F2T1	F2T2
SNK (P<0,05)	b	ab	b	a

Análise 80: Comparação da porcentagem de espermatozoides apresentando defeito de acrossoma entre os tratamentos no tempo de 12 horas (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	P
Total	39	0,2522			
Modelo	3	0,0503	0,0168	2,99	0,0438
Erro	36	0,2020	0,0056		

Coefficiente de Variação: 92,3751

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste			
	F1T1	F1T2	F2T1	F2T2
SNK (P<0,05)	b	ab	ab	a

Análise 81: Comparação da porcentagem de espermatozoides apresentando defeito de acrossoma entre os tratamentos no tempo de 24 horas (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	P
Total	39	0,2696			
Modelo	3	0,1389	0,0463	12,75	0,0001
Erro	36	0,1307	0,0036		

Coefficiente de Variação: 55,0379

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste			
	F1T1	F1T2	F2T1	F2T2
SNK (P<0,05)	b	a	b	a

Análise 82: Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de acrossoma entre os tratamentos no tempo de 36 horas (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	P
Total	39	0,2772			
Modelo	3	0,1454	0,0485	13,24	0,0001
Erro	36	0,1318	0,0037		

Coefficiente de Variação: 47,9974

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste			
	F1T1	F1T2	F2T1	F2T2
SNK (P<0,05)	b	a	b	a

Análise 83: Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de acrossoma entre os tratamentos no tempo de 48 horas (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	P
Total	39	0,3816			
Modelo	3	0,1622	0,0541	8,87	0,0002
Erro	36	0,2194	0,0061		

Coefficiente de Variação: 57,4490

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste			
	F1T1	F1T2	F2T1	F2T2
SNK (P<0,05)	b	a	b	a

Análise 84: Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de acrossoma entre os tratamentos no tempo de 72 horas (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	P
Total	39	0,4853			
Modelo	3	0,2656	0,0885	14,51	0,0001
Erro	36	0,2197	0,0061		

Coefficiente de Variação: 52,5103

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste			
	F1T1	F1T2	F2T1	F2T2
SNK (P<0,05)	b	a	b	a

Análise 85: Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de acrossoma nos diferentes tempos para o tratamento F1T1 (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F	P
Total	69	0,2208			
Modelo	6	0,0245	0,0041	1,31	0,2661
Erro	63	0,1963	0,0031		

Coefficiente de variação: 146,8478

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste						
	fresco	0h	12h	24h	36h	48h	72h
SNK (P<0,05)	A	A	A	A	A	A	A

Análise 86: Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de acrossoma nos diferentes tempos para o tratamento FIT2 (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F	P
Total	69	0,5624			
Modelo	6	0,3378	0,0563	15,79	0,0001
Erro	63	0,2246	0,0036		

Coefficiente de variação: 47,1528

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste						
	fresco	0h	12h	24h	36h	48h	72h
SNK (P<0,05)	D	CD	BC	AB	AB	A	A

Análise 87: Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de acrossoma nos diferentes tempos para o tratamento F2T1 (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F	P
Total	69	0,3215			
Modelo	6	0,0820	0,0137	3,60	0,0039
Erro	63	0,2394	0,0038		

Coefficiente de variação: 111,7847

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste						
	fresco	0h	12h	24h	36h	48h	72h
SNK (P<0,05)	BC	C	ABC	ABC	A	A	AB

Análise 88: Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando defeito de acrossoma nos diferentes tempos para o tratamento F2T2 (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F	P
Total	69	0,7899			
Modelo	6	0,4189	0,0698	11,85	0,0001
Erro	63	0,3710	0,0059		

Coefficiente de variação: 51,6039

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste						
	fresco	0h	12h	24h	36h	48h	72h
SNK (P<0,05)	D	CD	BC	AB	AB	AB	A

### Ih – Análises estatísticas referentes à tabela 23

Análise 89: Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando gota proximal entre as frações 1 e 2 no sêmen fresco (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fração	n	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Variância	T	DF	Prob> [T]
1	10	0,05	0,06	0,02	Desigual	0,5743	17,7	0,5730
2	10	0,04	0,05	0,02	Igual	0,5743	18,0	0,5729

Para H0: Variâncias são iguais, F' = 1,28      DF = 9, 9      Prob>F' = 0,7190

Análise 90: Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando gota proximal entre os tratamentos no tempo de 0 horas (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	P
Total	39	0,0919			
Modelo	3	0,0078	0,0026	1,12	0,3549
Erro	36	0,0841	0,0023		

Coefficiente de Variação: 155,3592

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste			
	F1T1	F1T2	F2T1	F2T2
SNK (P<0,05)	a	a	a	a

Análise 91: Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando gota proximal entre os tratamentos no tempo de 12 horas (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	P
Total	39	0,0809			
Modelo	3	0,0099	0,0033	1,67	0,1906
Erro	36	0,0710	0,0020		

Coefficiente de Variação: 200,7819

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste			
	F1T1	F1T2	F2T1	F2T2
SNK (P<0,05)	a	a	a	a

Análise 92: Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando gota proximal entre os tratamentos no tempo de 24 horas (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	P
Total	39	0,0753			
Modelo	3	0,0010	0,0003	0,16	0,9211
Erro	36	0,0743	0,0021		

Coefficiente de Variação: 181,3529

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste			
	F1T1	F1T2	F2T1	F2T2
SNK (P<0,05)	a	a	a	a

Análise 93: Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando gota proximal entre os tratamentos no tempo de 36 horas (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	P
Total	39	0,0914			
Modelo	3	0,0050	0,0017	0,70	0,5596
Erro	36	0,0863	0,0024		

Coefficiente de Variação: 139,6465

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste			
	F1T1	F1T2	F2T1	F2T2
SNK (P<0,05)	a	a	a	a

Análise 94: Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando gota proximal entre os tratamentos no tempo de 48 horas (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	P
Total	39	0,0361			
Modelo	3	0,0040	0,0013	1,50	0,2310
Erro	36	0,0321	0,0009		

Coefficiente de Variação: 298,1424

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste			
	F1T1	F1T2	F2T1	F2T2
SNK (P<0,05)	a	a	a	a

Análise 95: Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando gota proximal entre os tratamentos no tempo de 72 horas (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	P
Total	39	0,0726			
Modelo	3	0,0030	0,0010	0,51	0,6764
Erro	36	0,0697	0,0020		

Coefficiente de Variação: 208,6544

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste			
	F1T1	F1T2	F2T1	F2T2
SNK (P<0,05)	a	a	a	a

Análise 96: Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando gota proximal nos diferentes tempos para o tratamento F1T1 (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F	P
Total	69	0,1587			
Modelo	6	0,0187	0,0031	1,41	0,2264
Erro	63	0,1400	0,0022		

Coefficiente de variação: 158,0829

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste						
	fresco	0h	12h	24h	36h	48h	72h
SNK (P<0,05)		A	A	A	A	A	A

Análise 97: Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando gota proximal nos diferentes tempos para o tratamento F1T2 (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F	P
Total	69	0,1627			
Modelo	6	0,0160	0,0027	1,14	0,3480
Erro	63	0,1467	0,0023		

Coefficiente de variação: 154,4048

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste						
	fresco	0h	12h	24h	36h	48h	72h
SNK (P<0,05)	A	A	A	A	A	A	A

Análise 98: Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando gota proximal nos diferentes tempos para o tratamento F2T1 (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F	P
Total	69	0,1500			
Modelo	6	0,0147	0,0025	1,14	0,3475
Erro	63	0,1353	0,0021		

Coefficiente de variação: 171,9106

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste						
	fresco	0h	12h	24h	36h	48h	72h
SNK (P<0,05)	A	A	A	A	A	A	A

Análise 99: Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando gota proximal nos diferentes tempos para o tratamento F2T2 (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F	P
Total	69	0,1183			
Modelo	6	0,0130	0,0021	1,29	0,2768
Erro	63	0,1054	0,0017		

Coefficiente de variação: 190,5159

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste						
	fresco	0h	12h	24h	36h	48h	72h
SNK (P<0,05)	A	A	A	A	A	A	A

## II – Análises estatísticas referentes à tabela 24

Análise 100: Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando gota distal entre as frações 1 e 2 no sêmen fresco (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fração	n	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Variância	T	DF	Prob> [T]
1	10	0,18	0,05	0,02	Desigual	3,7135	15,3	0,0020
2	10	0,07	0,08	0,03	Igual	3,7135	18,0	0,0016

Para H0: Variâncias são iguais, F' = 2,46      DF = 9, 9      Prob>F' = 0,1969

Análise 101: Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando gota distal entre os tratamentos no tempo de 0 horas (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	P
Total	39	0,3071			
Modelo	3	0,0914	0,0305	5,09	0,0049
Erro	36	0,2158	0,0060		

Coefficiente de Variação: 59,4478

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste			
	F1T1	F1T2	F2T1	F2T2
SNK (P<0,05)	a	ab	bc	c

Análise 102: Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando gota distal entre os tratamentos no tempo de 12 horas (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	P
Total	39	0,2603			
Modelo	3	0,0995	0,0332	7,42	0,0005
Erro	36	0,1608	0,0045		

Coefficiente de Variação: 61,0642

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste			
	F1T1	F1T2	F2T1	F2T2
SNK (P<0,05)	a	b	b	b

Análise 103: Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando gota distal entre os tratamentos no tempo de 24 horas (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	P
Total	39	0,2748			
Modelo	3	0,1532	0,0511	15,13	0,0001
Erro	36	0,1216	0,0034		

Coefficiente de Variação: 57,0956

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste			
	F1T1	F1T2	F2T1	F2T2
SNK (P<0,05)	a	b	bc	c

Análise 104: Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando gota distal entre os tratamentos no tempo de 36 horas (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	P
Total	39	0,2991			
Modelo	3	0,0945	0,0315	5,55	0,0031
Erro	36	0,2045	0,0057		

Coefficiente de Variação: 65,1637

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste			
	F1T1	F1T2	F2T1	F2T2
SNK (P<0,05)	a	b	b	b

Análise 105: Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando gota distal entre os tratamentos no tempo de 48 horas (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	P
Total	39	0,2374			
Modelo	3	0,1219	0,0406	12,65	0,0001
Erro	36	0,1156	0,0032		

Coefficiente de Variação: 58,1750

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste			
	F1T1	F1T2	F2T1	F2T2
SNK (P<0,05)	a	b	b	c

Análise 106: Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando gota distal entre os tratamentos no tempo de 72 horas (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	P
Total	39	0,2290			
Modelo	3	0,0989	0,0330	9,13	0,0001
Erro	36	0,1300	0,0036		

Coefficiente de Variação: 49,0127

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste			
	F1T1	F1T2	F2T1	F2T2
SNK (P<0,05)	a	b	b	b

Análise 107: Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando gota distal nos diferentes tempos para o tratamento F1T1 (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F	P
Total	69	0,2875			
Modelo	6	0,0033	0,0006	0,12	0,9933
Erro	63	0,2842	0,0045		

Coefficiente de variação: 34,7491

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste						
	fresco	0h	12h	24h	36h	48h	72h
SNK (P<0,05)	A	A	A	A	A	A	A

Análise 108: Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando gota distal nos diferentes tempos para o tratamento F1T2 (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F	P
Total	69	0,3313			
Modelo	6	0,1066	0,0178	4,98	0,0003
Erro	63	0,2247	0,0036		

Coefficiente de variação: 52,6215

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste						
	fresco	0h	12h	24h	36h	48h	72h
SNK (P<0,05)	A	AB	BC	BC	BC	BC	C

Análise 109: Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando gota distal nos diferentes tempos para o tratamento F2T1 (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F	P
Total	69	0,3741			
Modelo	6	0,0254	0,0042	0,77	0,5992
Erro	63	0,3487	0,0055		

Coefficiente de variação: 83,5876

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste						
	fresco	0h	12h	24h	36h	48h	72h
SNK (P<0,05)	A	A	A	A	A	A	A

Análise 110: Comparação da percentagem de espermatozóides apresentando gota distal nos diferentes tempos para o tratamento F2T2 (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F	P
Total	69	0,2920			
Modelo	6	0,0361	0,0060	1,48	0,1999
Erro	63	0,2560	0,0041		

Coefficiente de variação: 98,6889

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste						
	fresco	0h	12h	24h	36h	48h	72h
SNK (P<0,05)	A	A	A	A	A	A	A

### Ij – Análises estatísticas referentes à tabela 25

Análise 111: Comparação da percentagem de defeitos espermáticos totais entre as frações 1 e 2 no sêmen fresco (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fração	n	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Variância	T	DF	Prob> [T]
1	10	0,34	0,07	0,02	Desigual	-1,0599	15,8	0,3052
2	10	0,37	0,05	0,01	Igual	-1,0599	18,0	0,3032

Para H0: Variâncias são iguais, F' = 2,21      DF = 9, 9      Prob>F' = 0,2519

Análise 112: Comparação da percentagem de defeitos espermáticos totais entre os tratamentos no tempo de 0 horas (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	P
Total	39	0,2578			
Modelo	3	0,1317	0,0439	12,53	0,0001
Erro	36	0,1261	0,0035		

Coefficiente de Variação: 15,5403

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste			
	F1T1	F1T2	F2T1	F2T2
SNK (P<0,05)	a	b	a	b

Análise 113: Comparação da percentagem de defeitos espermáticos totais entre os tratamentos no tempo de 12 horas (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	P
Total	39	0,2025			
Modelo	3	0,0544	0,0181	4,40	0,0097
Erro	36	0,1481	0,0041		

Coefficiente de Variação: 16,0248

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste			
	F1T1	F1T2	F2T1	F2T2
SNK (P<0,05)	a	b	a	ab

Análise 114: Comparação da percentagem de defeitos espermáticos totais entre os tratamentos no tempo de 24 horas (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	P
Total	39	0,1533			
Modelo	3	0,0374	0,0125	3,88	0,0168
Erro	36	0,1158	0,0032		

Coefficiente de Variação: 13,2946

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste			
	F1T1	F1T2	F2T1	F2T2
SNK (P<0,05)	a	b	a	ab

Análise 115: Comparação da percentagem de defeitos espermáticos totais entre os tratamentos no tempo de 36 horas (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	P
Total	39	0,1607			
Modelo	3	0,0138	0,0046	1,12	0,3524
Erro	36	0,1469	0,0041		

Coefficiente de Variação: 14,5286

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste			
	F1T1	F1T2	F2T1	F2T2
SNK (P<0,05)	a	a	a	a

Análise 116: Comparação da percentagem de defeitos espermáticos totais entre os tratamentos no tempo de 48 horas (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	P
Total	39	0,1640			
Modelo	3	0,0242	0,0081	2,07	0,1208
Erro	36	0,1398	0,0039		

Coefficiente de Variação: 13,7542

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste			
	F1T1	F1T2	F2T1	F2T2
SNK (P<0,05)	a	a	a	a

Análise 117: Comparação da percentagem de defeitos espermáticos totais entre os tratamentos no tempo de 72 horas (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	P
Total	39	0,2400			
Modelo	3	0,0165	0,0055	0,88	0,4581
Erro	36	0,2235	0,0062		

Coefficiente de Variação: 16,8582

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste			
	F1T1	F1T2	F2T1	F2T2
SNK (P<0,05)	a	a	a	a

Análise 118: Comparação da percentagem de defeitos espermáticos totais nos diferentes tempos para o tratamento F1T1 (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F	P
Total	69	0,3837			
Modelo	6	0,1323	0,0220	5,53	0,0001
Erro	63	0,2514	0,0040		

Coeficiente de variação: 14,3199

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste						
	fresco	0h	12h	24h	36h	48h	72h
SNK (P<0,05)	B	A	A	A	A	A	A

Análise 119: Comparação da percentagem de defeitos espermáticos totais nos diferentes tempos para o tratamento F1T2 (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F	P
Total	69	0,2910			
Modelo	6	0,1188	0,0198	7,25	0,0001
Erro	63	0,1722	0,0027		

Coeficiente de variação: 13,6719

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste						
	fresco	0h	12h	24h	36h	48h	72h
SNK (P<0,05)	D	D	CD	BCD	ABC	AB	A

Análise 120: Comparação da percentagem de defeitos espermáticos totais nos diferentes tempos para o tratamento F2T1 (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F	P
Total	69	0,4677			
Modelo	6	0,1032	0,0172	2,97	0,0128
Erro	63	0,3646	0,0058		

Coeficiente de variação: 17,1397

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste						
	fresco	0h	12h	24h	36h	48h	72h
SNK (P<0,05)	B	AB	AB	AB	AB	A	A

Análise 121: Comparação da percentagem de defeitos espermáticos totais nos diferentes tempos para o tratamento F2T2 (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fonte de Variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F	P
Total	69	0,3774			
Modelo	6	0,1447	0,0241	6,53	0,0001
Erro	63	0,2327	0,0037		

Coeficiente de variação: 15,1204

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste						
	fresco	0h	12h	24h	36h	48h	72h
SNK (P<0,05)	BC	C	ABC	AB	AB	AB	A

## II. Análises estatísticas referentes ao Experimento II

### IIa. Análises estatísticas referentes à tabela 8 (Material e métodos)

Análise 122: Comparação da distribuição das fêmeas por ordem de parto dentro de cada tratamento

	3ª OP	4ª OD	Total
F1T1	4/10	6/10	10/10
F1T2	5/10	5/10	10/10
F2T1	3/10	7/10	10/10
F2T2	4/10	6/10	10/10
Total	16/40	24/40	40/40
Teste estatístico	valor	GL	p>
Qui-quadrado	0,833	3	0,841

### IIb. Análises estatísticas referentes à tabela 9 (Material e métodos)

Análise 123: Comparação da frequência de utilização dos reprodutores suínos nas matrizes, por tratamento

	134	17787	22334	38498	38531	Total
F1T1	4/32	9/32	4/32	7/32	8/32	32/32
F1T2	5/32	6/32	7/32	5/32	9/32	32/32
F2T1	7/33	8/33	6/33	6/33	6/33	33/33
F2T2	5/33	7/33	8/33	6/33	7/33	33/33
Total	21/130	30/130	25/130	24/130	30/130	130/130
Teste estatístico	valor	GL	p>			
Qui-quadrado	3,957	12	0,984			

### IIc. Análises estatísticas referentes à tabela 26

Análise 124: Comparação do volume de sêmen entre as frações 1 e 2 do ejaculado

Tratamento	n	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Variância	T	DF	Prob> [T]
F1	21	15,00	0,000	0,000	Desigual	-13,443	20,0	0,000
F2	21	194,43	6,117	1,335	Igual	-13,443	40,0	0,000

Todos os valores são os mesmos para um nível de classe.

Análise 125: Comparação da motilidade espermática do sêmen a fresco ( $\arcsen \sqrt{\%}$ ) entre as frações 1 e 2

Tratamento	n	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Variância	T	DF	Prob> [T]
F1	21	1,03	0,061	0,013	Desigual	-0,443	39,3	0,660
F2	21	1,04	0,053	0,012	Igual	-0,443	40,0	0,660
Para H0: Variâncias são iguais, F' = 1,30					DF = 20,20	Prob>F' = 0,5662		

Análise 126: Comparação do vigor espermático do sêmen a fresco entre as frações 1 e 2

Tratamento	n	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Variância	T	DF	Prob> [T]
F1	21	4,40	0,436	0,095	Desigual	-0,192	38,7	0,849
F2	21	4,43	0,364	0,079	Igual	-0,192	40,0	0,849
Para H0: Variâncias são iguais, F' = 1,44					DF = 20,20	Prob>F' = 0,4207		

Análise 127: Comparação da concentração espermática por mL entre as frações 1 e 2								
Tratamento	n	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Variância	T	DF	Prob> [T]
F1	21	1414,29	712,549	155,491	Desigual	7,668	20,9	0,000
F2	21	208,10	108,820	23,746	Igual	7,668	40,0	0,000
Para H0: Variâncias são iguais, F' = 42,88					DF = 20,20	Prob>F' = 0,0000		

Análise 128: Comparação do número de espermatozoides móveis/mL entre as frações 1 e 2								
Tratamento	n	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Variância	T	DF	Prob> [T]
F1	21	1057,62	554,543	121,011	Desigual	7,393	20,8	0,000
F2	21	153,71	79,890	17,433	Igual	7,393	40,0	0,000
Para H0: Variâncias são iguais, F' = 48,18					DF = 20,20	Prob>F' = 0,0000		

Análise 129: Comparação do número de espermatozoides totais do ejaculado entre as frações 1 e 2								
Tratamento	n	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Variância	T	DF	Prob> [T]
F1	21	21,21	10,688	2,332	Desigual	-3,631	33,2	0,001
F2	21	37,38	17,383	3,793	Igual	-3,631	40,0	0,001
Para H0: Variâncias são iguais, F' = 2,65					DF = 20,20	Prob>F' = 0,0350		

Análise 130: Comparação do número total de espermatozoides móveis entre as frações 1 e 2								
Tratamento	n	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Variância	T	DF	Prob> [T]
F1	21	15,85	8,312	1,814	Desigual	-3,587	34,8	0,001
F2	21	27,61	12,525	2,733	Igual	-3,587	40,0	0,001
Para H0: Variâncias são iguais, F' = 2,27					DF = 20,20	Prob>F' = 0,0739		

Análise 131: Comparação do volume de sêmen por dose inseminante entre as frações 1 e 2								
Tratamento	n	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Variância	T	DF	Prob> [T]
F1	21	4,32	3,486	0,761	Desigual	-6,887	22,8	0,000
F2	21	24,82	13,192	2,879	Igual	-6,887	40,0	0,000
Para H0: Variâncias são iguais, F' = 14,32					DF = 20,20	Prob>F' = 0,0000		

Análise 132: Comparação do volume de diluidor por dose inseminante entre as frações 1 e 2								
Tratamento	n	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Variância	T	DF	Prob> [T]
F1	21	95,68	3,486	0,761	Desigual	6,887	22,8	0,000
F2	21	75,18	13,192	2,879	Igual	6,887	40,0	0,000
Para H0: Variâncias são iguais, F' = 14,32					DF = 20,20	Prob>F' = 0,0000		

Análise 133: Comparação do número potencial de fêmeas inseminadas entre as frações 1 e 2								
Tratamento	n	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Variância	T	DF	Prob> [T]
F1	21	5,28	2,770	0,605	Desigual	-3,588	34,7	0,001
F2	21	9,20	4,175	0,911	Igual	-3,588	40,0	0,001
Para H0: Variâncias são iguais, F' = 2,27					DF = 20,20	Prob>F' = 0,0738		

Análise 134: Comparação do número real de fêmeas inseminadas entre as frações 1 e 2

Tratamento	n	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Variância	T	DF	Prob> [T]
F1	21	3,05	2,179	0,475	Desigual	-0,134	39,6	0,894
F2	21	3,14	2,414	0,527	Igual	-0,134	40,0	0,894
Para H0: Variâncias são iguais, F' = 1,23					DF = 20,20	Prob>F' = 0,6508		

Análise 135: Comparação do tempo da colheita do sêmen à diluição entre as frações 1 e 2

Tratamento	n	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Variância	T	DF	Prob> [T]
F1	21	17,81	3,723	0,812	Desigual	-3,762	34,1	0,001
F2	18	22,67	4,256	1,003	Igual	-3,802	37,0	0,001
Para H0: Variâncias são iguais, F' = 1,31					DF = 17,20	Prob>F' = 0,5619		

Análise 136: Comparação do tempo da colheita do sêmen ao resfriamento entre as frações 1 e 2

Tratamento	n	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Variância	T	DF	Prob> [T]
F1	21	61,14	26,865	5,862	Desigual	0,681	36,3	0,500
F2	18	55,33	26,272	6,192	Igual	0,681	37,0	0,501
Para H0: Variâncias são iguais, F' = 1,05					DF = 20,17	Prob>F' = 0,9350		

### IIId. Análises estatísticas referentes à tabela 30

Análise 137: Comparação da motilidade espermática (arcsen  $\sqrt{\%}$ ) entre os tratamentos para a primeira inseminação

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	P
Total	39	0,3820			
Modelo	3	0,2680	0,0893	28,21	0,001
Erro	36	0,1140	0,0032		
Coeficiente de Variação: 5,9759					

Teste estatístico	Agrupamento pelo teste			
	F1T1	F1T2	F2T1	F2T2
SNK (P<0,05)	c	b	ab	a

Análise 138: Comparação da motilidade espermática entre os diluidores para a primeira inseminação

Diluidor	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Variância	T	GL	Prob>[T]
Glicina	20	69,500	6,0481	1,3523	Desigual	3,2773	30,7	0,0026
MR-A	20	60,750	10,2950	2,3020	Igual	3,2773	38,0	0,0022
Para Ho: variâncias são iguais, F' = 2,90					GL=19,19	Prob>F' = 0,0252		

Análise 139: Comparação da motilidade espermática entre as frações do ejaculado para a primeira inseminação

Fração	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Variância	T	GL	Prob>[T]
1	20	59,000	8,8257	1,9735	Desigual	-5,3750	30,4	0,0001
2	20	71,150	5,0977	1,1398	Igual	-5,3750	38,0	0,0000
Para Ho: variâncias são iguais, F' = 3,00					GL=19,19	Prob>F' = 0,0211		

Análise 140: Comparação do vigor espermático entre tratamentos para a primeira inseminação

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado médio	F	P
Total	39	8,6937			
Modelo	3	3,7188	1,2396	8,97	0,0001
Erro	36	4,9750	0,1382		

CV: 10,1500

Análise 141: Comparação do vigor espermático entre as frações do ejaculado para a primeira inseminação (Teste t)

Fração	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Variância	T	GL	Prob>[T]
1	20	3,47	0,47	0,11	Desigual	-2,7079	37,0	0,0102
2	20	3,85	0,40	0,09	Igual	-2,7079	38,0	0,0101

Para Ho: variâncias são iguais, F<sup>2</sup>= 1,39

GL=(19, 19)

Prob>F<sup>2</sup>= 0,4803

Análise 142: Comparação vigor espermático entre os diluidores para a primeira inseminação (Teste t)

Diluidor	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Variância	T	GL	Prob>[T]
Glicina-gema	20	3,87	0,36	0,08	Desigual	3,1568	35,0	0,0033
MR-A	20	3,45	0,48	0,11	Igual	3,1568	35,0	0,0031

Para Ho: variâncias são iguais, F<sup>2</sup>= 1,83

GL=19,19

Prob>F<sup>2</sup>= 0,1987

### IIe. Análises estatísticas referentes à tabela 31

Análise 143: Comparação da motilidade espermática (arcsen  $\sqrt{\%}$ ) entre os tratamentos para a segunda inseminação

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado médio	F	P
Total	39	0,2949			
Modelo	3	0,1570	0,0523	13,68	0,0001
Erro	36	0,1378	0,0038		

CV: 6,5918

Análise 144: Comparação da motilidade espermática entre as frações do ejaculado para a segunda inseminação (Teste t)

Fração	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Variância	T	GL	Prob>[T]
1	20	0,90	0,08	0,02	Desigual	-3,3561	37,7	0,0018
2	20	0,98	0,07	0,02	Igual	-3,3561	38,0	0,0018

Para Ho: variâncias são iguais, F<sup>2</sup>= 1,19

GL= (19, 19)

Prob>F<sup>2</sup>= 0,7040

Agrupamento pelo teste

Teste estatístico	Fração 1	Fração 2
Teste t	B	A

Análise 145: Comparação da motilidade espermática entre os diluidores para a segunda inseminação (Teste t)

Diluidor	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Variância	T	GL	Prob>[T]
Glicina	20	0,98	0,06	0,01	Desigual	3,9299	35,8	0,0004
MR-A	20	0,89	0,08	0,02	Igual	3,9299	38,0	0,0003

Para Ho: variâncias são iguais, F<sup>2</sup>= 1,67

GL= (19, 19)

Prob>F<sup>2</sup>= 0,2737

Agrupamento pelo teste

Teste estatístico	Glicina-gema de ovo	MR-A
Teste t	a	b

Análise 146: Comparação do vigor espermático entre os tratamentos para a segunda inseminação

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado médio	F	P
Total	39	9,2750			
Modelo	3	3,8250	1,2750	8,42	0,002
Erro	36	5,4500	0,1514		

CV: 10,5874

Análise 147: Comparação do vigor espermático entre as frações do ejaculado para a segunda inseminação

Fração	Vigor espermático- 2ª IA	
	Média	Erro padrão
1	3,58	0,09
2	3,78	0,09
P = 0,1128		

Análise 148: Comparação do vigor espermático entre os diluidores para a segunda inseminação

Diluidor	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Variância	T	GL	Prob>[T]
Glicina	20	3,95	0,39	0,09	Desigual	4,2886	37,9	0,0001
MR-A	20	3,40	0,42	0,09	Igual	4,2886	38,0	0,0001
Para Ho: variâncias são iguais, F'= 1,12				GL= (19, 19)		Prob>F'= 0,8095		

Agrupamento pelo teste

Teste estatístico	Glicina-gema de ovo	MR-A
Teste t	c	d

### IIf. Análises estatísticas referentes à tabela 32

Análise 149: Comparação da motilidade espermática (arcsen √%) entre os tratamentos para a terceira inseminação

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado médio	F	P
Total	38	0,1539			
Modelo	3	0,0461	0,0154	5,00	0,0055
Erro	35	0,1078	0,0030		
CV: 5,7843					

Análise 150: Comparação da motilidade espermática entre as frações do ejaculado para a terceira inseminação (Teste t)

Fração	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Variância	T	GL	Prob>[T]
1	19	0,94	0,06	0,01	Desigual	-2,3426	35,9	0,0248
2	20	0,98	0,06	0,01	Igual	-2,3503	37,0	0,0242
Para Ho: variâncias são iguais, F'= 1,28				GL= (18, 19)		Prob>F'= 0,5930		

Agrupamento pelo teste

Teste estatístico	Fração 1	Fração 2
Teste t	B	A

Análise 151: Comparação da motilidade espermática entre os diluidores para a terceira inseminação (Teste t)

Diluidor	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Variância	T	GL	Prob>[T]
Glicina	20	0,98	0,04	0,01	Desigual	2,5883	27,4	0,0153
MR-A	19	0,93	0,07	0,02	Igual	2,6260	37,0	0,0125
Para Ho: variâncias são iguais, F'= 3,43				GL= (18, 19)		Prob>F'= 0,0107		

Agrupamento pelo teste

Teste estatístico	Glicina-gema de ovo	MR-A
Teste t	a	b

Análise 152: Comparação do vigor espermático entre os tratamentos para a terceira inseminação

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado médio	F	P
Total	38	8,3590			
Modelo	3	1,7590	0,5863	3,11	0,0387
Erro	35	6,6000	0,1886		
CV: 11,7202					

Análise 153: Comparação do vigor espermático entre as frações do ejaculado para a terceira inseminação

Fração	Vigor espermático- 3ª IA	
	Média	Erro padrão
1	3,66	0,10
2	3,75	0,11
P = 0,5470		

Análise 154: Comparação do vigor espermático entre os diluidores para a terceira inseminação

Diluidor	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Variância	T	GL	Prob>[T]
Glicina	20	3,90	0,42	0,09	Desigual	2,9082	36,6	0,0061
MR-A	19	3,50	0,44	0,10	Igual	2,9125	37,0	0,0060
Para Ho: variâncias são iguais, F'= 1,12				GL= (18, 19)		Prob>F'= 0,8074		

Agrupamento pelo teste

Teste estatístico	Glicina-gema de ovo	MR-A
Teste t	c	d

### IIg. Análises estatísticas referentes à tabela 33

Análise 155: Comparação da motilidade espermática (arcsen √%) entre os tratamentos para a quarta inseminação

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado médio	F	P
Total	10	0,1059			
Modelo	3	0,0789	0,0263	6,81	0,0175
Erro	7	0,0270	0,0039		
CV: 6,8889					

Análise 156: Comparação da motilidade espermática entre as frações do ejaculado para quarta inseminação (Teste t)

Fração	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Variância	T	GL	Prob>[T]
1	5	0,83	0,08	0,03	Desigual	-3,0648	8,7	0,0141
2	6	0,97	0,08	0,03	Igual	-3,0598	9,0	0,0136
Para Ho: variâncias são iguais, F'= 1,03				GL= (4, 5)		Prob>F'= 1,0000		

Agrupamento pelo teste

Teste estatístico	Fração 1	Fração 2
Teste t	B	A

Análise 157: Comparação da motilidade espermática entre os diluidores para a quarta inseminação (Teste t)

Diluidor	Motilidade na 4ª IA	
	Média	Erro padrão
Glicina-gema de ovo	67,00	4,06
MR-A	56,67	3,33
P = 0,0781		

Análise 158: Comparação do vigor espermático entre os tratamentos para a quarta inseminação

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado médio	F	P
Total	10	3,9090			
Modelo	3	1,6174	0,5391	1,65	0,2638
Erro	7	2,2917	0,3274		
CV: 16,7837					

Análise 159: Comparação do vigor espermático entre as frações do ejaculado para a quarta inseminação

Fração	Vigor na 4ªIA	
	Média	Erro padrão
1	3,13	0,26
2	3,67	0,23
P = 0,1660		

Análise 160: Comparação do vigor espermático entre os diluidores para a quarta inseminação

Diluidor	Vigora na 4ªIA	
	Média	Erro padrão
Glicina-gema de ovo	3,63	0,26
MR-A	3,17	0,23
P = 0,2322		

### III. Análises estatísticas referentes à tabela 34

Tabela 47. Dados referentes aos parâmetros de controle de fêmeas suínas, inseminadas com sêmen diluído e resfriado a 5° ou 17°C, em contêiner especial

Variáveis	F1T1		F1T2		F2T1		F2T2	
	Média	Erro padrão	Média	Erro padrão	Média	Erro padrão	Média	Erro padrão
Ordem de parto	3,60	0,16	3,50	0,16	3,70	0,16	3,60	0,16
IDC	76,07	5,33	85,74	5,33	86,21	5,33	87,77	5,33
Duração do cio	58,13	2,89	63,85	2,89	63,99	2,89	60,82	2,89
Cio – 1ª IA	18,62	0,71	18,72	0,71	19,31	0,71	18,87	0,71
Colheita – 1ª IA	21,70	2,34	17,86	2,34	18,44	2,34	16,37	2,34
Duração da 1ªIA	5,33	0,53	6,62	0,53	4,54	0,53	6,77	0,53
Cio – 2ªIA	30,33	0,76	30,85	0,76	31,05	0,76	31,22	0,76
Colheita – 2ªIA	16,62	1,99	16,58	1,99	26,40	1,99	17,89	1,99
Duração da 2ªIA	6,54	0,68	6,26	0,68	4,86	0,68	7,88	0,68
Intervalo 1ª-2ª IA	11,71	0,47	12,14	0,47	11,74	0,47	12,36	0,47
Cio – 3ªIA	42,04	1,18	43,39	1,12	43,56	1,12	42,88	1,12
Colheita – 3ªIA	14,97	2,89	17,01	2,74	22,18	2,74	23,79	2,74
Duração da 3ªIA	7,49	0,60	6,13	0,57	5,50	0,57	6,91	0,57
Intervalo 2ª-3ª IA	11,90	0,96	12,65	0,91	12,51	0,91	11,66	0,91
Cio – 4ªIA	66,98	1,46	65,60	1,78	67,11	1,46	66,35	1,46
Colheita – 4ªIA	26,37	4,75	25,42	5,82	22,63	4,75	28,51	4,75
Duração da 4ªIA	5,92	0,99	6,40	1,21	5,81	0,99	5,07	0,99
Intervalo 3ª-4ªIA	24,96	0,71	24,53	0,87	23,94	0,71	23,75	0,71
Última IA-fim cio	9,61	2,10	15,45	2,10	13,25	2,10	10,82	2,10
Nº Inseminações	3,20	0,16	3,20	0,16	3,30	0,16	3,30	0,16

Análise 161: Comparação da ordem de parto das fêmeas distribuídas entre os tratamentos

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado médio	F	P
Total	39	9,6000			
Modelo	3	0,2000	0,0667	0,26	0,8570
Erro	36	9,4000	0,2611		
CV: 14,194					

Análise 162: Comparação do intervalo desmame-cio das fêmeas entre os tratamentos

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado médio	F	P
Total	39	849,4576			
Modelo	3	10226,8394	283,1525	1,00	0,4054
Erro	36	11076,2970	284,0789		
CV: 20,077					

Análise 163: Comparação da duração do cio das fêmeas entre os tratamentos

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado médio	F	P
Total	39	3230,9100			
Modelo	3	234,0649	78,0216	0,94	0,4328
Erro	36	2996,8451	83,2456		
CV: 14,788					

Análise 164: Comparação do intervalo do início do cio à primeira inseminação entre os tratamentos

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado médio	F	P
Total	39	182,5995			
Modelo	3	2,7609	0,9203	0,18	0,9064
Erro	36	179,8386	4,9955		
CV: 11,8398					

Análise 165: Comparação do intervalo da colheita do sêmen à primeira inseminação entre os tratamentos

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado médio	F	P
Total	39	2121,6763			
Modelo	3	151,4936	50,4978	0,92	0,4397
Erro	36	1970,1828	54,7273		
CV: 39,7848					

Análise 166: Comparação da duração da primeira inseminação entre os tratamentos

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado médio	F	P
Total	39	134,9940			
Modelo	3	34,0402	11,3467	4,05	0,0141
Erro	36	100,9538	2,8043		
CV: 28,8016					

Análise 167: Comparação do intervalo do início do cio à segunda inseminação entre os tratamentos

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado médio	F	P
Total	39	211,5474			
Modelo	3	4,5340	1,5114	0,26	0,8517
Erro	36	207,0133	5,7504		
CV: 7,7701					

Análise 168: Comparação do intervalo da colheita do sêmen à segunda inseminação entre os tratamentos

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado médio	F	P
Total	39	2090,4272			
Modelo	3	670,4809	223,4936	5,67	0,0028
Erro	36	1419,9462	39,4430		
CV: 32,4223					

Teste estatístico

LSM (p<0,05)

Tratamentos	Valor
F1T1 x F1T2	0,9893
F1T1 x F2T1	0,0013
F1T1 x F2T2	0,6541
F1T2 x F2T1	0,0013
F1T2 x F2T2	0,6445
F2T1 x F2T2	0,0045

Agrupamento pelo teste

LSM (p<0,05)	F1T1	F1T2	F2T1	F2T2
	b	b	a	b

Análise 169: Comparação da duração da segunda inseminação entre os tratamentos

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado médio	F	P	
Total	39	211,0812				
Modelo	3	46,0143	15,3381	3,35	0,0297	
Erro	36	165,0669	4,5852			
CV: 33,5313						
Teste estatístico						
LSM (p<0,05)						
Tratamentos				Valor		
F1T1 x F1T2				0,7685		
F1T1 x F2T1				0,0875		
F1T1 x F2T2				0,1709		
F1T2 x F2T1				0,1530		
F1T2 x F2T2				0,0989		
F2T1 x F2T2				0,0032		
Agrupamento pelo teste						
LSM (p<0,05)			F1T1	F1T2	F2T1	F2T2
			cd	cd	d	c

Análise 170: Comparação do intervalo entre a primeira e segunda inseminações entre os tratamentos

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado médio	F	P
Total	39	84,1110			
Modelo	3	2,9685	0,9895	0,44	0,7265
Erro	36	81,1425	2,2540		
CV: 12,5274					

Análise 171: Comparação do intervalo do início cio à terceira inseminação entre os tratamentos

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado médio	F	P
Total	38	453,9926			
Modelo	3	13,1294	4,3765	0,35	0,7912
Erro	35	440,8632	12,5961		
CV: 8,2555					

Análise 172: Comparação do intervalo da colheita do sêmen à terceira inseminação entre os tratamentos

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado médio	F	P
Total	38	3128,4661			
Modelo	3	502,2918	167,4306	2,23	0,1018
Erro	35	2626,1743	75,0335		
CV: 44,1891					

Análise 173: Comparação da duração da terceira inseminação entre os tratamentos

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado médio	F	P
Total	38	135,2363			
Modelo	3	21,8674	7,2891	2,25	0,0997
Erro	35	113,3689	3,2391		
CV: 27,7674					
Teste estatístico					
LSM (p<0,05)					
Tratamentos				Valor	
F1T1 x F1T2				0,1080	
F1T1 x F2T1				0,0216	
F1T1 x F2T2				0,4877	
F1T2 x F2T1				0,4427	
F1T2 x F2T2				0,3367	
F2T1 x F2T2				0,0888	

Agrupamento pelo teste

LSM (p<0,05)	F1T1	F1T2	F2T1	F2T2
	a	ab	b	ab

Análise 174: Comparação do intervalo entre a segunda e terceira inseminações entre os tratamentos

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado médio	F	P
Total	38	294,2890			
Modelo	3	6,7531	2,2510	0,27	0,8437
Erro	35	287,5359	8,2153		
CV: 23,5224					

Análise 175: Comparação do intervalo do início do cio à quarta inseminação entre os tratamentos

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado médio	F	P
Total	10	47,9114			
Modelo	3	3,4157	1,1386	0,18	0,9072
Erro	7	44,4957	6,3565		
CV: 3,7860					

Análise 176: Comparação do intervalo da colheita do sêmen à quarta inseminação entre os tratamentos

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado médio	F	P
Total	10	528,2154			
Modelo	3	53,531	17,8437	0,26	0,8500
Erro	7	474,6842	67,8120		
CV: 31,9674					

Análise 177: Comparação da duração da quarta inseminação entre os tratamentos

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado médio	F	P
Total	10	22,9097			
Modelo	3	2,3278	0,7759	0,26	0,8494
Erro	7	20,5819	2,9403		
CV: 29,8543					

Análise 178: Comparação do intervalo da terceira e quarta inseminações entre os tratamentos

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado médio	F	P
Total	10	13,1894			
Modelo	3	2,6996	0,8999	0,60	0,6349
Erro	7	10,4899	1,4986		
CV: 5,0439					

Análise 179: Comparação do intervalo da última inseminação ao final do cio entre os tratamentos

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado médio	F	P
Total	39	1791,4935			
Modelo	3	202,4393	67,4798	1,53	0,2237
Erro	36	1589,0542	44,1404		

CV: 54,096

Análise 180: Comparação do número de inseminações realizadas por fêmea/estro dentro de cada tratamento

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado médio	F	P
Total	39	9,5000			
Modelo	3	0,1000	0,0333	0,13	0,9431
Erro	36	9,4000	0,2611		

CV: 15,723

### III. Análises estatísticas referentes à tabela 35

Análise 181: Comparação da ordem de parto das fêmeas entre os diluidores, independentemente da fração do ejaculado

Diluidor	Ordem de parto	
	Média	Erro padrão
Glicina-gema de ovo	3,55	0,11
MR-A	3,65	0,11

P = 0,5399

Análise 182: Comparação do intervalo desmame-cio entre os diluidores, independentemente da fração do ejaculado

Diluidor	IDC	
	Média	Erro padrão
Glicina-gema de ovo	86,76	3,77
MR-A	81,14	3,77

P = 0,2991

Análise 183: Comparação da duração do cio das fêmeas por diluidor, independentemente da fração do ejaculado

Diluidor	Duração do cio	
	Média	Erro padrão
Glicina-gema de ovo	62,34	2,04
MR-A	61,06	2,04

P = 0,6612

Análise 184: Comparação do intervalo do início cio à primeira inseminação por diluidor, independentemente da fração do ejaculado

Diluidor	intervalo cio-IA	
	Média	Erro padrão
Glicina-gema de ovo	18,79	0,50
MR-A	18,96	0,50

P = 0,8102

Análise 185: Comparação do intervalo da colheita do sêmen à primeira inseminação por diluidor, independentemente da fração do ejaculado

Diluidor	intervalo coleta-IA	
	Média	Erro padrão
Glicina-gema de ovo	17,12	1,65
MR-A	20,07	1,65

P = 0,2147

Análise 186: Comparação da duração da primeira inseminação por diluidor, independentemente da fração do ejaculado

Diluidor	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Variância	T	GL	Prob>[T]
Glicina	20	6,69	1,8223	0,4074	Desigual	3,3553	36,4	0,0019
MR-A	20	4,94	1,4697	0,3286	Igual	3,3553	38,0	0,0018
Para Ho: variâncias são iguais, F' = 2,90				GL=19,19				Prob>F' = 0,0252

Análise 187: Comparação do intervalo do início do cio à segunda inseminação por diluidor, independentemente da fração do ejaculado

Diluidor	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Variância	T	GL	Prob>[T]
Glicina	20	6,69	1,8223	0,4074	Desigual	3,3553	36,4	0,0019
MR-A	20	4,94	1,4697	0,3286	Igual	3,3553	38,0	0,0018
Para Ho: variâncias são iguais, F' = 2,90				GL=19,19				Prob>F' = 0,0252

Análise 188: Comparação do intervalo entre a primeira e segunda inseminações por diluidor, independentemente da fração do ejaculado

Diluidor	Intervalo 1 <sup>a</sup> – 2 <sup>a</sup> IA	
	Média	Erro padrão
Glicina-gema de ovo	12,25	0,34
MR-A	11,72	0,34
P = 0,2793		

Análise 189: Comparação do intervalo do início do cio à terceira inseminação por diluidor, independentemente da fração do ejaculado

Diluidor	Intervalo cio – 3 <sup>a</sup> IA	
	Média	Erro padrão
Glicina-gema de ovo	43,14	0,79
MR-A	42,80	0,82
P = 0,7691		

Análise 190: Comparação do intervalo da colheita do sêmen à terceira inseminação por diluidor, independentemente da fração do ejaculado

Diluidor	Intervalo colheita – 3 <sup>a</sup> IA	
	Média	Erro padrão
Glicina-gema de ovo	20,40	2,33
MR-A	18,77	1,75
P = 0,5819		

Análise 191: Comparação do intervalo entre a segunda e terceira inseminações por diluidor, independentemente da fração do ejaculado

Diluidor	Intervalo 2 <sup>a</sup> – 3 <sup>a</sup> IA	
	Média	Erro padrão
Glicina-gema de ovo	12,15	0,64
MR-A	12,20	0,66
P = 0,9553		

Análise 192: Comparação do intervalo do início do cio à quarta inseminação por diluidor, independentemente da fração do ejaculado

Diluidor	Intervalo cio – 4 <sup>a</sup> IA	
	Média	Erro padrão
Glicina-gema de ovo	65,97	1,15
MR-A	67,05	1,03
P = 0,5093		

Análise 193: Comparação do intervalo da colheita do sêmen à quarta inseminação por diluidor, independentemente da fração do ejaculado

Diluidor	Intervalo colheita do sêmen – 4ªIA	
	Média	Erro padrão
Glicina-gema de ovo	26,97	3,76
MR-A	24,50	3,36
P = 0,6392		

Análise 194: Comparação da duração da quarta inseminação por diluidor, independentemente da fração do ejaculado

Diluidor	Duração da 4ªIA	
	Média	Erro padrão
Glicina-gema de ovo	5,73	0,78
MR-A	5,87	0,70
P = 0,9019		

Análise 195: Comparação do intervalo entre a terceira e quarta inseminações por diluidor, independentemente da fração do ejaculado

Diluidor	Intervalo 3ª – 4ªIA	
	Média	Erro padrão
Glicina-gema de ovo	24,14	0,56
MR-A	24,45	0,50
P = 0,6908		

Análise 196: Comparação do intervalo da última inseminação ao final do cio por diluidor, independentemente da fração do ejaculado

Diluidor	Última IA final do cio	
	Média	Erro padrão
Glicina-gema de ovo	13,13	1,49
MR-A	11,43	1,49
P = 0,4235		

Análise 197: Comparação do número de inseminações em cada fêmea/estro, por diluidor, independentemente da fração do ejaculado

Diluidor	número de inseminações	
	Média	Erro padrão
Glicina-gema de ovo	3,25	0,11
MR-A	3,25	0,11
P = 1,0000		

## IIj. Análises estatísticas referentes à tabela 36

Análise 198: Comparação da ordem de parto das fêmeas por fração do ejaculado, independentemente do diluidor

Fração	Ordem de parto	
	Média	Erro padrão
1	3,55	0,11
2	3,65	0,11
P = 0,5399		

Análise 199: Comparação do intervalo desmame-cio por fração, independentemente do diluidor

Fração	IDC	
	Média	Erro padrão
1	80,91	3,77
2	86,99	3,77
P = 0,2614		

Análise 200: Comparação na duração do cio das fêmeas por fração do ejaculado, independentemente do diluidor

Fração	Duração do cio	
	Média	Erro padrão
1	60,99	2,04
2	62,41	2,04
p = 0,6266		

Análise 201: Comparação do intervalo do início do cio à primeira inseminação por fração do ejaculado, independentemente do diluidor

Fração	intervalo cio-IA	
	Média	Erro padrão
1	18,67	0,50
2	19,09	0,50
P = 0,5570		

Análise 202: Comparação do intervalo da colheita do sêmen à primeira inseminação por fração do ejaculado, independentemente do diluidor

Fração	intervalo coleta-IA	
	Média	Erro padrão
1	19,78	1,65
2	17,41	1,65
P = 0,3170		

Análise 203: Comparação da duração da primeira inseminação por fração do ejaculado, independentemente do diluidor

Fração	Duração da IA	
	Média	Erro padrão
1	5,97	0,37
2	5,66	0,37
P = 0,5538		

Análise 204: Comparação do intervalo do início do cio à segunda inseminação por fração do ejaculado, independentemente do diluidor

Fração	Intervalo cio- 2ª IA	
	Média	Erro padrão
1	30,59	0,54
2	31,14	0,54
P = 0,4750		

Análise 205: Comparação do intervalo entre a primeira e segunda inseminações por fração do ejaculado, independentemente do diluidor

Fração	Intervalo 1ª - 2ª IA	
	Média	Erro padrão
1	11,92	0,34
2	12,05	0,34
P = 0,7882		

Análise 206: Comparação do intervalo do início do cio à terceira inseminação por fração do ejaculado, independentemente do diluidor

Fração	Intervalo cio - 3ª IA	
	Média	Erro padrão
1	42,71	0,81
2	43,22	0,79
P = 0,6601		

Análise 207: Comparação do intervalo da colheita do sêmen à terceira inseminação por fração do ejaculado, independentemente do diluidor

Fração	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Variância	T	GL	Prob>[T]
1	19	16,04	9,33	2,14	Desigual	-2,5433	34,7	0,0156
2	20	22,99	7,58	1,69	Igual	-2,5570	37,0	0,0148
Para Ho: variâncias são iguais, F'= 1,52				GL= (18, 19)		Prob>F' = 0,3764		

Agrupamento pelo teste

Teste estatístico	Fração 1	Fração 2
Teste t	b	a

Análise 208: Comparação do intervalo entre a segunda e terceira inseminações por fração do ejaculado, independentemente do diluidor

Fração	Intervalo 2 <sup>a</sup> – 3 <sup>a</sup> IA	
	Média	Erro padrão
1	12,27	0,66
2	12,08	0,64
P = 0,8384		

Análise 209: Comparação do intervalo do início do cio à quarta inseminação por fração do ejaculado, independentemente do diluidor

Fração	Intervalo cio – 4 <sup>a</sup> IA	
	Média	Erro padrão
1	66,29	1,15
2	66,73	1,03
P = 0,7839		

Análise 210: Comparação do intervalo da colheita do sêmen à quarta inseminação por fração do ejaculado, independentemente do diluidor

Fração	Intervalo colheita do sêmen – 4 <sup>a</sup> IA	
	Média	Erro padrão
1	25,89	3,76
2	25,57	3,36
P = 0,9507		

Análise 211: Comparação da duração da quarta inseminação por fração do ejaculado, independentemente do diluidor

Fração	Duração da 4 <sup>a</sup> IA	
	Média	Erro padrão
1	6,16	0,78
2	5,44	0,70
P = 0,5173		

Análise 212: Comparação do intervalo entre a terceira e quarta inseminação por fração do ejaculado, independentemente do diluidor

Fração	Intervalo 3 <sup>a</sup> – 4 <sup>a</sup> IA	
	Média	Erro padrão
1	24,74	0,56
2	23,84	0,50
P = 0,2694		

Análise 213: Comparação do intervalo da última inseminação ao final do cio por fração do ejaculado, independentemente do diluidor

Fração	Última IA final do cio	
	Média	Erro padrão
1	12,53	1,49
2	12,03	1,49
P = 0,8154		

Análise 214: Comparação do número de inseminações por fêmea/estro por fração do ejaculado, independentemente do diluidor

Fração	número de inseminações	
	Média	Erro padrão
1	3,20	0,11
2	3,30	0,11
P = 0,5399		

### III. Análises estatísticas referentes à tabela 37

Análise 215: Comparação do intervalo da colheita do sêmen à segunda inseminação entre os tratamentos

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado médio	F	P
Total	39	2090,4272			
Modelo	3	670,4809	223,4936	5,67	0,0028
Erro	36	1419,9462	39,4430		
CV: 32,4223					

Teste estatístico

LSM (p<0,05)

Tratamentos	Valor
F1T1 x F1T2	0,9893
F1T1 x F2T1	0,0013
F1T1 x F2T2	0,6541
F1T2 x F2T1	0,0013
F1T2 x F2T2	0,6445
F2T1 x F2T2	0,0045

Agrupamento pelo teste

LSM (p<0,05)	F1T1	F1T2	F2T1	F2T2
	b	b	a	b

Análise 216: Comparação da duração da segunda inseminação entre os tratamentos

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado médio	F	P
Total	39	211,0812			
Modelo	3	46,0143	15,3381	3,35	0,0297
Erro	36	165,0669	4,5852		
CV: 33,5313					

Teste estatístico

LSM (p<0,05)

Tratamentos	Valor
F1T1 x F1T2	0,7685
F1T1 x F2T1	0,0875
F1T1 x F2T2	0,1709
F1T2 x F2T1	0,1530
F1T2 x F2T2	0,0989
F2T1 x F2T2	0,0032

Agrupamento pelo teste

LSM (p<0,05)	F1T1	F1T2	F2T1	F2T2
	cd	cd	d	c

Análise 217: Comparação da duração da terceira inseminação entre os tratamentos

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado médio	F	P	
Total	38	135,2363				
Modelo	3	21,8674	7,2891	2,25	0,0997	
Erro	35	113,3689	3,2391			
CV: 27,7674						
Teste estatístico						
LSM (p<0,05)						
Tratamentos				Valor		
F1T1 x F1T2				0,1080		
F1T1 x F2T1				0,0216		
F1T1 x F2T2				0,4877		
F1T2 x F2T1				0,4427		
F1T2 x F2T2				0,3367		
F2T1 x F2T2				0,0888		
Agrupamento pelo teste						
LSM (p<0,05)			F1T1	F1T2	F2T1	F2T2
			a	ab	b	ab

### II.m. Análises estatísticas referentes à tabela 38

Análise 218: Comparação do período de manifestação do cio das porcas ao longo do dia, por tratamento

	manhã	tarde	noite	total
F1T1	4/10	4/10	2/10	10/10
F1T2	4/10	3/10	3/10	10/10
F2T1	3/10	5/10	2/10	10/10
F2T2	6/10	2/10	2/10	10/10
Total	17/40	14/40	9/40	40/40
Teste estatístico	valor	GL	P>	
Qui-quadrado	2,880	6	0,824	

### II.n. Análises estatísticas referentes à tabela 39

Análise 219: Comparação da distribuição do número de inseminações realizadas por fêmea e por tratamento

	2 IA	3 IA	4 IA	Total
F1T1	1/10	6/10	3/10	10/10
F1T2	0/10	8/10	2/10	10/10
F2T1	0/10	7/10	3/10	10/10
F2T2	0/10	7/10	3/10	10/10
Total	1/40	28/10	11/40	40/40
Teste estatístico	valor	GL	p>	
Qui-quadrado	3,558	6	0,736	

## IIo. Análises estatísticas referentes à tabela 41

Análise 220: Comparação da ordem de parto das fêmeas utilizadas, entre os tratamentos

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado médio	F	P
Total	39	9,3750			
Modelo	3	0,2750	0,0917	0,36	0,7803
Erro	36	9,1000	0,2528		
CV: 13,8696					

Análise 221: Comparação das taxas de gestação entre os tratamentos

Frequência	F1T1	F1T2	F2T1	F2T2	Total
Gestação +	10	10	10	8	38
Gestação -	0	0	0	2	2
Total	10	10	10	10	40
Teste Estatístico	Valor		GL	P>	
Qui-quadrado	6,316		3	0,097	

Análise 222: Comparação do número de leitões nascidos totais entre os tratamentos

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado médio	F	P	
Total	37	561,3947				
Modelo	3	63,9197	21,3066	1,46	0,2438	
Erro	34	497,4750	14,6316			
CV: 26,2848						
Agrupamento pelo teste						
Teste estatístico			F1T1	F1T2	F2T1	F2T2
SNK			a	a	a	a

Análise 223: Comparação do número de leitões nascidos vivos entre os tratamentos

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado médio	F	P	
Total	36	436,3243				
Modelo	3	66,5672	22,1891	1,98	0,1361	
Erro	33	369,7571	11,2048			
CV: 25,4840						
Agrupamento pelo teste						
Teste estatístico			F1T1	F1T2	F2T1	F2T2
SNK			a	a	a	a

Análise 224: Comparação do número de leitões natimortos entre os tratamentos

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado médio	F	P	
Total	36	31,6757				
Modelo	3	3,7757	1,2586	1,49	0,2357	
Erro	33	27,9000	0,8454			
CV: 113,4033						
Agrupamento pelo teste						
Teste estatístico			F1T1	F1T2	F2T1	F2T2
SNK			a	a	a	a

Análise 225: Comparação do número de leitões mumificados entre os tratamentos

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado médio	F	P	
Total	37	33,3947				
Modelo	3	3,3197	1,1066	1,25	0,3066	
Erro	34	30,0750	0,8846			
CV: 170,1875						
Agrupamento pelo teste						
Teste estatístico			F1T1	F1T2	F2T1	F2T2
SNK			a	a	a	a

## IIp. Análises estatísticas referentes à tabela 42

Análise 226: Comparação da ordem de parto das fêmeas utilizadas, entre as frações do ejaculado, independentemente do diluidor (Teste t)

Fração	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Variância	T	GL	Prob>[T]
1	20	3,55	0,52	0,11	Desigual	-0,9667	37,7	0,3399
2	20	3,70	0,47	0,11	Igual	-0,9667	38,0	0,3398
Para Ho: variâncias são iguais, F'= 1,18					GL= (19, 19)	Prob>F'= 0,7239		

Análise 227: Comparação das taxas de gestação entre as frações do ejaculado, independentemente do diluidor

Frequência	Fração 1	Fração 2	Total
Gestação +	20	18	38
Gestação -	0	2	2
Total	20	20	40
Teste Estatístico	Valor	GL	P>
Qui-quadrado	2,105	1	0,147

Análise 228: Comparação do número de leitões nascidos totais, entre as frações do ejaculado, independentemente do diluidor (Teste t)

Fração	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Variância	T	GL	Prob>[T]
1	20	14,55	4,05	0,90	Desigual	-0,0043	35,9	0,9966
2	18	14,56	3,84	0,90	Igual	-0,0043	36,0	0,9966
Para Ho: variâncias são iguais, F'= 1,11					GL= (19, 17)	Prob>F'= 0,8332		

Análise 229: Comparação do número de leitões nascidos vivos, entre as frações do ejaculado, independentemente do diluidor (Teste t)

Fração	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Variância	T	GL	Prob>[T]
1	20	13,30	3,67	0,82	Desigual	0,3109	34,8	0,7577
2	17	12,94	3,34	0,81	Igual	0,3085	35,0	0,7595
Para Ho: variâncias são iguais, F'= 1,21					GL= (19, 16)	Prob>F'= 0,7120		

Análise 230: Comparação do número de leitões natimortos, entre as frações do ejaculado, independentemente do diluidor (Teste t)

Fração	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Variância	T	GL	Prob>[T]
1	20	0,60	0,75	0,17	Desigual	-1,4652	27,8	0,1541
2	17	1,06	1,09	0,26	Igual	-1,5088	35,0	0,1403
Para Ho: variâncias são iguais, F'= 2,08					GL= (16, 19)	Prob>F'= 0,1285		

Análise 231: Comparação do número de leitões mumificados, entre as frações do ejaculado, independentemente do diluidor (Teste t)

Fração	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Variância	T	GL	Prob>[T]
1	20	0,65	1,18	0,26	Desigual	0,6817	29,2	0,5008
2	18	0,44	0,62	0,15	Igual	0,6609	36,0	0,5129
Para Ho: variâncias são iguais, F'= 3,69					GL= (19, 17)	Prob>F'= 0,0093		

## IIq. Análises estatísticas referentes à tabela 43

Análise 232: Comparação da ordem de parto das fêmeas utilizadas, entre os diluidores, independentemente da fração do ejaculado (Teste t)

Diluidor	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Variância	T	GL	Prob>[T]
MR-A	20	3,65	0,49	0,11	Desigual	0,3188	38,0	0,7517
Glicina	20	3,60	0,50	0,11	Igual	0,3188	38,0	0,7517
Para Ho: variâncias são iguais, F'= 1,05					GL= (19, 19)	Prob>F'= 0,9084		

Análise 233: Comparação das taxas de gestação entre os diluidores, independentemente da fração do ejaculado

Frequência	MR-A	Glicina-gema de ovo	Total
Gestação +	20	18	38
Gestação -	0	2	2
Total	20	20	40
Teste Estatístico	Valor	GL	P>
Qui-quadrado	2,105	1	0,147

Análise 234: Comparação do número de leitões nascidos totais, entre os diluidores, independentemente da fração do ejaculado (Teste t)

Diluidor	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Variância	T	GL	Prob>[T]
MR-A	20	15,60	3,93	0,88	Desigual	1,8072	36,0	0,0791
Glicina	18	13,39	3,62	0,85	Igual	1,7992	36,0	0,0804
Para Ho: variâncias são iguais, F'= 1,18				GL= (19, 17)		Prob>F'= 0,7386		

Análise 235: Comparação do número de leitões nascidos vivos, entre os diluidores, independentemente da fração do ejaculado (Teste t)

Diluidor	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Variância	T	GL	Prob>[T]
MR-A	20	14,25	3,54	0,79	Desigual	2,2560	35,0	0,0304
Glicina	17	11,82	3,00	0,73	Igual	2,2258	35,0	0,0326
Para Ho: variâncias são iguais, F'= 1,39				GL= (19, 16)		Prob>F'= 0,5144		

Análise 236: Comparação do número de natimortos, entre os diluidores, independentemente da fração do ejaculado (Teste t)

Diluidor	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Variância	T	GL	Prob>[T]
MR-A	20	0,70	1,03	0,23	Desigual	-0,7892	34,9	0,4353
Glicina	17	0,94	0,83	0,20	Igual	-0,7751	35,0	0,4435
Para Ho: variâncias são iguais, F'= 1,55				GL= (19, 16)		Prob>F'= 0,3769		

Análise 237: Comparação do número de mumificados, entre os diluidores, independentemente da fração do ejaculado (Teste t)

Diluidor	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Variância	T	GL	Prob>[T]
MR-A	20	0,65	1,18	0,26	Desigual	0,6817	29,2	0,5008
Glicina	18	0,44	0,62	0,15	Igual	0,6609	36,0	0,5129
Para Ho: variâncias são iguais, F'= 3,69				GL= (19, 17)		Prob>F'= 0,0093		

### III. Análises estatísticas referentes à tabela 44

Análise 238: Comparação do volume do ejaculado entre as frações 1 e 2

Fração	n	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Mínimo	Máximo	Variância	T	DF	Prob> [T]
1	31	15,00	0,00	0,00	15,000	15,000	Desigual	-18,906	30,0	0,001
2	31	199,12	5,42	0,01	102,000	313,000	Igual	-18,906	60,0	0,000

Todos os valores são os mesmos para um nível de classe.

Análise 239: Comparação da motilidade espermática no sêmen fresco entre as frações 1 e 2 (arcsen  $\sqrt{\%}$ )

Fração	n	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Mínimo	Máximo	Variância	T	DF	Prob> [T]
1	31	1,04	0,05	0,01	0,886	1,173	Desigual	-0,399	59,3	0,691
2	31	1,04	0,05	0,01	0,938	1,173	Igual	-0,399	60,0	0,691
Para H0: Variâncias são iguais, F' = 1,24				DF = 30,30		Prob>F' = 0,5598				

Análise 240: Comparação do vigor espermático no sêmen fresco entre as frações 1 e 2

Fração	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Variância	T	GL	Prob>[T]	
1	31	4,50	0,43	0,08	Desigual	1,0968	59,2	0,2772	
2	31	4,39	0,38	0,07	Igual	1,0968	60,0	0,2771	
Para Ho: variâncias são iguais, F' = 1,26					GL = (30, 30)	Prob>F' = 0,5265			

Análise 241: Comparação da concentração espermática por mL entre as frações 1 e 2

Fração	n	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Mínimo	Máximo	Variância	T	DF	Prob> [T]
1	31	1503,87	677,14	121,62	340,00	2900,00	Desigual	10,4370	31,4	0,0001
2	31	220,32	101,65	18,26	57,00	505,00	Igual	10,4370	60,0	0,0000
Para H0: Variâncias são iguais, F' = 44,38					DF = (30, 30)	Prob>F' = 0,0000				

Análise 242: Comparação do número de espermatozóides móveis/mL entre as frações 1 e 2

Fração	n	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Mínimo	Máximo	Variância	T	DF	Prob> [T]
1	31	1126,65	530,89	95,35	238,000	2175,000	Desigual	9,989	31,3	0,001
2	31	163,99	77,75	13,96	46,000	378,700	Igual	9,989	60,0	0,000
Para H0: Variâncias são iguais, F' = 46,63					DF = 30,30	Prob>F' = 0,0000				

Análise 243: Comparação do número de espermatozóides totais entre as frações 1 e 2

Fração	n	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Mínimo	Máximo	Variância	T	DF	Prob> [T]
1	31	22,56	10,16	1,82	5,100	43,500	Desigual	-5,272	48,9	0,001
2	31	41,36	17,06	3,06	12,900	76,500	Igual	-5,272	60,0	0,000
Para H0: Variâncias são iguais, F' = 2,82					DF = 30,30	Prob>F' = 0,0058				

Análise 244: Comparação do número total de espermatozóides móveis entre as frações 1 e 2

Fração	n	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Mínimo	Máximo	Variância	T	DF	Prob> [T]
1	31	16,89	7,96	1,43	3,600	32,600	Desigual	-5,065	49,7	0,001
2	31	30,76	13,01	2,34	10,300	61,200	Igual	-5,065	60,0	0,000
Para H0: Variâncias são iguais, F' = 2,67					DF = 30,30	Prob>F' = 0,0089				

Análise 245: Comparação do volume de sêmen utilizado por dose inseminante, entre as frações 1 e 2

Fração	n	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Mínimo	Máximo	Variância	T	DF	Prob> [T]
1	31	3,82	3,03	0,54	1,400	12,600	Desigual	-8,679	34,0	0,001
2	31	22,69	11,73	2,11	7,900	65,200	Igual	-8,679	60,0	0,000
Para H0: Variâncias são iguais, F' = 14,99					DF = 30,30	Prob>F' = 0,0000				

Análise 246: Comparação do volume de diluidor utilizado por dose inseminante entre as frações 1 e 2

Fração	n	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Mínimo	Máximo	Variância	T	DF	Prob> [T]
1	31	96,18	3,03	0,54	87,400	98,600	Desigual	8,679	34,0	0,001
2	31	77,31	11,73	2,11	34,800	92,100	Igual	8,679	60,0	0,000
Para H0: Variâncias são iguais, F' = 14,99					DF = 30,30	Prob>F' = 0,0000				

Análise 247: Comparação do número potencial de fêmeas inseminadas entre as frações 1 e 2

Fração	n	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Mínimo	Máximo	Variância	T	DF	Prob> [T]
1	31	5,63	2,66	0,48	1,2	10,87	Desigual	-5,0632	49,7	0,0001
2	31	10,25	4,33	0,78	3,43	20,40	Igual	-5,0632	60,0	0,0000
Para H0: Variâncias são iguais, F' = 2,66					DF = (30, 30)	Prob>F' = 0,0090				

Análise 248: Comparação do tempo da colheita do sêmen à diluição entre as frações 1 e 2

Fração	n	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Mínimo	Máximo	Variância	T	DF	Prob> [T]
1	31	17,39	3,52	0,63	12,00	27,00	Desigual	-2,7633	46,9	0,0082
2	28	20,61	5,18	0,98	9,00	28,00	Igual	-2,8166	57,0	0,0067
Para H0: Variâncias são iguais, F' = 2,17					DF = (27, 30)			Prob>F' = 0,0413		

Análise 249: Comparação do tempo da colheita do sêmen ao resfriamento entre as frações 1 e 2

Fração	n	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Mínimo	Máximo	Variância	T	DF	Prob> [T]
1	31	56,10	23,57	4,23	30,00	137,00	Desigual	1,1809	56,6	0,2426
2	28	48,93	23,02	4,35	21,00	129,00	Igual	1,1794	57,0	0,2431
Para H0: Variâncias são iguais, F' = 1,05					DF = (30, 27)			Prob>F' = 0,9051		



Anexo V: Ficha de controle do sêmen dos varrões, oriundos da Fração 2 do ejaculado

<b>FICHA PARA AVALIAÇÃO DO SÊMEN</b>
--------------------------------------

<b>Varrão/nº ejaculado:</b>	<b>Fração utilizada:</b>
<b>Raça:</b>	<b>Volume:</b>
<b>Data da coleta:</b>	<b>Cor/aspecto:</b>
<b>Horário:</b>	<b>Motilidade:</b>
<b>Nº de montas:</b>	<b>Vigor:</b>
<b>Duração da ejaculação:</b>	<b>Concentração:</b>

**CONCENTRAÇÃO ESPERMÁTICA**

1.  $\frac{\text{1ª contagem}}{\text{1ª contagem}} + \frac{\text{2ª contagem}}{\text{2ª contagem}} = \frac{\text{2}}{\text{2}} = \text{2} \times 5 \times 10^6 = \text{10} \text{ sptz/mL}$

2. Total espermatozoides/fração =  $\frac{\text{sptz/mL}}{\text{sptz/mL}} \times \text{volume} = \text{volume} \times 10^9 \text{ sptz}$

3. Móveis/fração =  $\frac{\text{total sptz}}{\text{total sptz}} \times \text{motilidade} = \text{motilidade} \times 10^9 \text{ sptz}$

4. Número de doses/fração =  $\frac{\text{móveis/fração}}{3 \times 10^9} = \text{móveis/fração} \div 3 \times 10^9$

5. Horário da diluição: \_\_\_\_\_ 6. Horário do resfriamento: \_\_\_\_\_

7. Temperatura: \_\_\_\_\_ 8. Diluidor: \_\_\_\_\_

<b>PORCAS INSEMINADAS</b>					
<b>Número</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Nº da IA</b>	<b>Data</b>	<b>Horário</b>	<b>Obs</b>

**OBS:**

Anexo VI: Ficha de avaliação do sêmen dos varrões, nos diferentes períodos de estocagem

FICHA PARA AVALIAÇÃO DO SÊMEN			
Varrão/n° ejaculado:		Cor/aspecto:	
Raça:	Volume	1ª fração:	2ª fração:
Data da coleta:	Motilidade	1ª fração:	2ª fração:
N° de montas:	Vigor	1ª fração:	2ª fração:
Duração da ejaculação:	Concentração	1ª fração:	2ª fração:
Hora da coleta:		Hora do resfriamento:	

AVALIAÇÃO DO SÊMEN/TEMPO												
TEMPO	0		12		24		36		48		72	
HORA												
TRATAMENTO	<i>mot</i>	<i>vigor</i>	<i>mot</i>	<i>vigor</i>	<i>mot</i>	<i>vigor</i>	<i>mot</i>	<i>vigor</i>	<i>mot</i>	<i>vigor</i>	<i>mot</i>	<i>vigor</i>

**OBS:**



**Anexo VIII: Ficha utilizada para o controle dos partos**

**FICHA DE PARTOS**

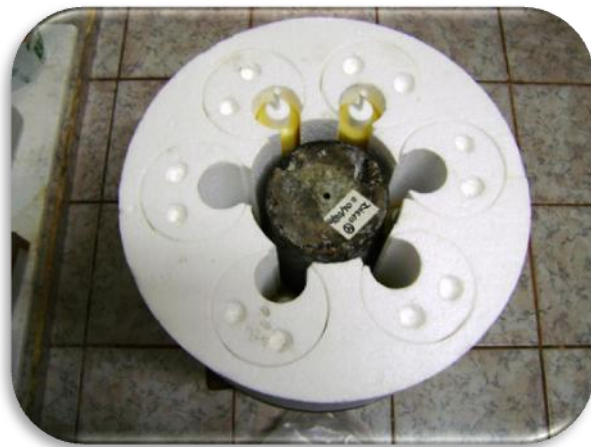
N° Porca:	Ordem parto:	Tratam.:	Data parto:
Nasc. Totais	Nasc. Vivos	Natimorto	Mumificado
OBS:			

N° Porca:	Ordem parto:	Tratam.:	Data parto:
Nasc. Totais	Nasc. Vivos	Natimorto	Mumificado
OBS:			

N° Porca:	Ordem parto:	Tratam.:	Data parto:
Nasc. Totais	Nasc. Vivos	Natimorto	Mumificado
OBS:			

N° Porca:	Ordem parto:	Tratam.:	Data parto:
Nasc. Totais	Nasc. Vivos	Natimorto	Mumificado
OBS:			

**Anexo IX. Contêiner utilizado**



## Anexo X. Coleta das duas frações do ejaculado



## Anexo XI. Manejo das fêmeas e inseminação artificial



Etapas da inseminação artificial



## Anexo XII. Morfologia espermática

