

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
Colegiado do Curso de Pós-graduação

**EFICIÊNCIA REPRODUTIVA DE FÊMEAS SUÍNAS
INSEMINADAS COM SÊMEN HETEROSPÉRMICO
HIPERCONCENTRADO E REDILUÍDO APÓS 12
HORAS DE ARMAZENAMENTO A 5°C NO DILUIDOR
GLICINA- GEMA DE OVO**

CAROLINA LIMA ALVARES DA SILVA

Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG
2011

CAROLINA LIMA ALVARES DA SILVA

**EFICIÊNCIA REPRODUTIVA DE FÊMEAS SUÍNAS
INSEMINADAS COM SÊMEN HETEROSPÉRMICO
HIPERCONCENTRADO E REDILUÍDO APÓS 12
HORAS DE ARMAZENAMENTO A 5°C NO
DILUIDOR GLICINA-GEMA DE OVO**

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

2011

S586e

Silva, Carolina Lima Alvares da, 1984-

Eficiência reprodutiva de fêmeas suínas inseminadas com sêmen heterospérmico hiperconcentrado e rediluído após 12 horas de armazenamento a 5°C no diluidor glicina-gema de ovo / Carolina Lima Alvares da Silva. – 2011.

260p.: 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. Sêmen – Transporte – Teses. 4. Inseminação artificial – 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 10 de outubro de 2011, pela Comissão Examinadora constituída por:



Prof. José Monteiro da Silva Filho
Presidente



Prof. Aníbal Sant'Anna Moretti



Prof. Ernane Fagundes do Nascimento



Prof. Helton Mattana Saturnino



Prof. Roberto Mauricio Carvalho Guedes

“... é bem certo que a humanidade tem necessidade de homens práticos, que tirem o máximo lucro de seu trabalho e sem esquecer o bem geral, salvaguardem os interesses particulares. Mas tem também necessidade dos sonhadores, para os quais os prolongamentos desinteressados de um empreendimento mostram-se de tal modo cativantes que lhes é impossível consagrar cuidados aos seus próprios benefícios materiais. Esses sonhadores não merecem a riqueza, já que não a desejam. Entretanto, uma sociedade bem organizada deveria assegurar-lhes os meios de desempenhar a sua missão, numa vida desembaraçada de preocupações materiais e livremente consagrada à pesquisa”.

Maria Sklodowski Curie

“...The future requires that you do not spend too much time dreaming about the past.”

Dr. Bonadonna à Foote, 1948.

Dedico ao meu amado filho, Artur

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por guiar sempre meus passos e por estar sempre comigo;

Agradeço ao meu pai, por ser a pessoa que é, por acreditar sempre em mim e me apoiar em todas as minhas decisões, mesmo sendo tão exigente... o senhor é um exemplo para mim;

Agradeço à Confraria Gomes Lima, por ser minha família maravilhosa e estar sempre comigo em todos os momentos; mas em especial à Tia Sueli e ao Tio Landinho, sem os quais eu nada poderia ter feito... amo vocês;

Aos meus irmãos; Clá, Fer e Carlos, por compreenderem meus momentos de ausência, por me incentivarem sempre a ir mais longe e por serem sempre tão amigos e companheiros;

Ao João, que foi acima de tudo o meu melhor amigo e esteve sempre ao meu lado, além de ter me incentivado e me ajudado em tudo... e também por todo amor e compreensão, você é e sempre será o amor da minha vida;

À família Pereira, vocês também são minha família, e me proporcionaram ótimos momentos de descontração e alegria, além de sempre demonstrarem todo apoio e carinho, muito obrigada por tudo;

À Escola de Veterinária da UFMG, pela acolhida e pelos ensinamentos; por ter sido minha casa nestes quase oito anos aqui vividos, tenho orgulho de ter minhas raízes aqui;

Ao professor José Monteiro pela orientação, e por ser para mim um exemplo de dedicação, disciplina e de competência, com o senhor aprendi muito sempre, muito obrigada por tudo;

À professora Maristela Silveira Palhares, por toda ajuda e principalmente pelas análises estatísticas;

À todos os professores do Setor de Reprodução da EV-UFMG, Marc Henry, Antonio Pinho e Monique Lagares; mas em especial aos professores Álan Maia Borges e Vicente Ribeiro do Vale, sempre dispostos a me atender e me ajudar desde a graduação e principalmente durante o mestrado;

Ao Dário, técnico do Setor de Reprodução, pela ajuda durante o experimento;

Aos funcionários da EV-UFMG, principalmente ao Fabinho e ao Luíz;

Agradeço em especial ao Doutor Glauber Souza de Machado, sem o qual este experimento não teria sido possível, principalmente por ter me possibilitado a alegria de realizar este trabalho na Miunça, pelo apoio sempre em todos os momentos do meu mestrado, você é acima de tudo uma referência para mim como profissional: muito obrigada por tudo!

Ao Senhor Rubens Valentini e à Dona Sônia, pela ótima acolhida nestes nove meses em que estive na Miunça e pela enorme consideração por mim; mas não posso deixar de agradecer de forma especial ao Senhor Rubens, por tudo, mas principalmente pelo amadurecimento como profissional que em muito devo ao senhor;

Ao Wilson, Valdecir, Delmo, Zé Renato e *Tanim* pelo apoio incondicional durante o experimento e por toda ajuda; mas em especial ao Zé Renato e *Tanim*, pelas várias vezes em que se dispuseram a acordar de madrugada para acompanhar e ajudar no experimento, o que permitiu sua execução dentro da rotina da central;

À toda equipe da Granja Miunça, que acreditaram sempre no experimento e se dedicaram inteiramente à sua execução, fato que possibilitou tudo e foi fundamental para o sucesso deste trabalho; nada é possível sem a cooperação de muitos, e vocês foram indispensáveis: Alcides, Dudu, Cícero, Vânio, Leo, Reis, D. Elza, *Seu Wilson*, Maicon, Gildeon e Cleiton; com vocês aprendi muito e só tenho a agradecer por terem sido tão amigos e companheiros;

À Lyze, que se tornou minha irmãzinha... pela amizade, companheirismo e imensa dedicação ao experimento;

Ao Doutor Moacir Furtado pela colaboração;

Às companheiras de mestrado, Amanda, Laura, Alice e Rute, pela maravilhosa convivência, pelas muitas horas de estudo e também pelos momentos que pareciam trágicos e hoje se tornaram tão engraçados; a amizade aqui estabelecida foi talvez um dos maiores ganhos que tivemos neste curso, a vocês meus sinceros agradecimentos e meu carinho sempre;

Agradeço à Natália e à Laura, por terem colaborado com a execução deste experimento e se dispuseram a se deslocar até Brasília somente para me ajudar; o que foi muito importante; mas devo agradecer em especial à minha amiga Nicole, que permaneceu comigo durante a maior parte do experimento, sempre com toda dedicação e interesse em aprender e ajudar; e que acima de tudo me proporcionou momentos de boas gargalhadas... Todas vocês foram fundamentais, muito obrigada a todas;

À Amanda Pimenta Siqueira por toda colaboração, pelas conversas e pelas muitas vezes em que me atendeu prontamente para me ajudar;

À minha querida Raissa Rossi, amiga do coração que sempre me apoiou, acreditou em mim e me incentivou a fazer o melhor que pude, sempre me orientando e sempre ao meu lado me ajudando em tudo;

Ao Diego Alkmin, pela disponibilidade em me ajudar durante o experimento piloto aqui na escola;

Ao estagiário Marcos por toda ajuda com os animais durante o período que eles permaneceram na Escola para o projeto piloto; à Maria que me ajudou muito na preparação dos materiais para o experimento, e finalmente a Ana Maria Carvalhaes, que me ajudou na parte final do experimento;

À Fapemig pela bolsa de estudos;

Aos professores Ernane Fagundes, Roberto Guedes, Anibal Moretti e Helton Saturnino por aceitarem participar da minha defesa e contribuírem para a minha dissertação.

Muito obrigada a todos!!

SUMÁRIO

	LISTA DE FICHAS.....	14
	LISTA DE FIGURAS.....	14
	LISTA DE TABELAS.....	15
	LISTA DE ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	17
	RESUMO.....	29
	ABSTRACT.....	31
1.	INTRODUÇÃO.....	32
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	35
2.1.	O ejaculado do varrão.....	35
2.2.	Características das frações do ejaculado do varrão.....	37
2.3.	Características físicas e morfológicas do sêmen.....	43
2.3.1.	Avaliação do varrão e coleta do sêmen.....	44
2.3.2.	Volume, coloração e aspecto do sêmen.....	46
2.3.3.	Temperatura, pH e pressão osmótica do sêmen.....	47
2.3.4.	Motilidade e vigor espermáticos.....	48
2.3.5.	Aglutinação espermática.....	49
2.3.6.	Concentração espermática.....	50
2.3.7.	Morfologia espermática.....	51
2.3.8.	Resumo dos parâmetros seminais mínimos de qualidade do ejaculado do varrão.....	57
2.4.	Fatores a serem considerados no processo de resfriamento e/ou transporte do sêmen diluído de suínos.....	58
2.4.1.	Variação individual de varrões.....	58
2.4.2.	Tipo de colheita do sêmen: total ou fracionada.....	60
2.4.2.1.	Características físicas do sêmen de varrões submetidos à colheita total ou fracionada e armazenadas <i>in vitro</i> à diferentes temperaturas e períodos de estocagem.....	60
2.4.2.2.	Fertilidade do sêmen de varrões submetidos à colheita total ou fracionada.....	64
2.4.3.	Tempo para a diluição do sêmen.....	66
2.4.4.	Diluidores de sêmen de suíno.....	67
2.4.4.1.	Componentes dos diluidores.....	67

2.4.4.1.1.	Água.....	68
2.4.4.1.2.	Açúcares.....	69
2.4.4.1.3.	Eletrólitos.....	71
2.4.4.1.4.	Macromoléculas.....	71
2.4.4.1.4.1.	Gema de ovo.....	71
2.4.4.1.4.2.	Albumina Sérica Bovina.....	75
2.4.4.1.5.	Tampões.....	76
2.4.4.1.6.	Quelantes.....	77
2.4.4.1.7.	Antioxidantes.....	77
2.4.4.1.8.	Antibióticos.....	79
2.4.4.2.	Controle da qualidade microbiológica do sêmen.....	81
2.4.5.	Efeito da taxa de diluição, volume da dose inseminante e concentração espermática por mL e por dose inseminante.....	83
2.4.6.	Tempo de incubação prévia do sêmen ou “holding time”.....	87
2.4.7.	Efeito da taxa de resfriamento do sêmen de varrões em contêiner especial.....	89
2.4.8.	Influência da temperatura final de armazenamento do sêmen.....	91
2.4.9.	Influência do período de armazenamento do sêmen de varrões.....	93
2.5.	Endocrinologia da fêmea suína.....	95
2.5.1.	Período pós-parto.....	96
2.5.2.	Período pós-desmame.....	99
2.5.3.	Intervalo desmame-cio.....	100
2.5.3.1.	Fatores que afetam o intervalo desmame-cio (IDC).....	101
2.5.3.1.1.	Exposição ao macho.....	101
2.5.3.1.2.	Duração da lactação.....	103
2.5.3.1.3.	Ordem de parto.....	104
2.5.3.1.4.	Efeito da genética e da linhagem das fêmeas.....	105
2.5.4.	Duração do estro.....	107
2.6.	Inseminação artificial em suínos.....	109
2.6.1.	Momento ideal de inseminação.....	110
2.6.2.	Número e intervalo entre inseminações.....	111
2.6.2.1.	Sincronização do cio, sincronização da ovulação e inseminação artificial em tempo fixo.....	113

3.	MATERIAL E MÉTODOS	116
3.1.	Localização geográfica, caracterização climática e período experimental.....	116
3.2.	Delineamento experimental e animais utilizados.....	116
3.2.1.	Experimento I: Eficiência reprodutiva de fêmeas suínas inseminadas com sêmen oriundo de doses heterospérmicas hiperconcentradas, contendo 15 bilhões de espermatozoides, resfriadas à 5°C e rediluídas para doses inseminantes de 100 mL, contendo 3 bilhões de espermatozoides, após 12 horas de armazenamento.....	117
3.2.2.	Experimento II: Eficiência reprodutiva de fêmeas suínas inseminadas com sêmen oriundo de doses heterospérmicas hiperconcentradas, contendo 24 bilhões de espermatozoides, resfriadas à 5°C e rediluídas para doses inseminantes de 100 mL, contendo 3 bilhões de espermatozoides, após 12 horas de armazenamento.....	119
3.3.	Procedimentos relacionados aos machos.....	120
3.3.1.	Alojamento, manejo nutricional e reprodutivo dos varrões durante o período experimental.....	120
3.3.2.	Coleta do sêmen.....	120
3.3.2.1.	Avaliação física do sêmen.....	122
3.3.2.2.	Processamento do sêmen.....	123
3.3.2.2.1.	Diluidor utilizado.....	123
3.3.2.2.2.	Preparo do diluidor.....	123
3.3.2.2.3.	Diluição do sêmen.....	125
3.3.3.	Resfriamento e armazenamento do sêmen.....	126
3.3.3.1.	Contêiner utilizado e taxa de resfriamento.....	126
3.3.3.2.	Avaliação e período de armazenamento do sêmen resfriado.....	126
3.3.4.	Rediluição do sêmen.....	127
3.4.	Procedimentos relacionados às fêmeas.....	128
3.4.1.	Manejo nutricional e reprodutivo das fêmeas durante o período experimental.....	128
3.4.2.	Intervalo desmame-estro, manifestação e duração do estro.....	130
3.4.3.	Inseminação artificial e diagnóstico de gestação.....	130
3.4.4.	Eficiência reprodutiva.....	131
3.5.	Análises estatísticas.....	132

4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	132
4.1.	Experimento I: Efeito da hiperconcentração de doses seminais heterospérmicas (15 bilhões de espermatozoides por dose de 100 mL) rediluídas após 12 horas de armazenamento a 5°C sobre as características físicas do sêmen avaliado a fresco, pós diluído e pós rediluição para doses padrão (3 bilhões/100 mL) e armazenadas por 12, 24 e 36 horas após a coleta e sobre a fertilidade de fêmeas suínas inseminadas.....	132
4.1.1.	Características físicas do sêmen e desempenho reprodutivo dos varrões.....	132
4.1.2.	Parâmetros de controle, fertilidade e prolificidade das fêmeas suínas inseminadas com doses seminais heterospérmicas hiperconcentradas (15 bilhões de espermatozoides por dose) rediluídas após 12 horas de armazenamento a 5°C para doses padrão (3 bilhões) e de fêmeas inseminadas com doses seminais heterospérmicas padrão armazenadas por 12, 24 e 36 horas após a coleta.....	141
4.2.	Experimento II: Efeito da hiperconcentração de doses seminais heterospérmicas (24 bilhões de espermatozoides por dose de 100 mL) rediluídas após 12 horas de armazenamento à 5°C sobre as características físicas do sêmen avaliado a fresco, pós diluído, pós rediluição para doses padrão (3 bilhões/100 mL) e armazenadas por 12, 24 e 36 horas após a coleta e sobre a fertilidade de fêmeas suínas inseminadas.....	151
4.2.1.	Características físicas do sêmen e desempenho reprodutivo dos varrões.....	151
4.2.2.	Parâmetros de controle, fertilidade e prolificidade das fêmeas suínas inseminadas com doses seminais heterospérmicas hiperconcentradas (24 bilhões de espermatozoides por dose) rediluídas após 12 horas de armazenamento a 5°C para doses padrão (3 bilhões) e de fêmeas inseminadas com doses seminais heterospérmicas padrão armazenadas por 12, 24 e 36 horas após a coleta.....	163
5.	CONCLUSÕES.....	178
6.	PROPOSTAS PARA O FUTURO.....	179
7.	REFERÊNCIAS.....	180
8.	FICHAS USADAS.....	216
9.	FIGURAS.....	220
10.	ANEXOS.....	227

LISTA DE FICHAS

8	FICHAS USADAS.....	216
8.1	Ficha de coleta e avaliação do sêmen.....	216
8.2	Ficha das inseminações.....	217
8.3	Ficha para acompanhamento do cio e diagnóstico de gestação.....	218
8.4	Ficha de acompanhamento dos partos.....	219

LISTA DE FIGURAS

9	FIGURAS	
Figura 1	Delineamento experimental e processamento do sêmen durante os experimentos.....	118
Figura 2	Coleta fracionada de sêmen no tubo falcon.....	220
Figura 3	Preparação do diluidor.....	220
Figura 3.1	Água utilizada para a preparação do diluidor em erlenmeyer e termômetro para conferência da temperatura.....	220
Figura 3.2	Separação da gema	221
Figura 3.3	Eversão da gema separada da clara no béquer.....	221
Figura 3.4	Solução inicial do diluidor GGO pronta e provetas contendo a gema separada.....	222
Figura 3.5	Adição da gema de ovo à solução inicial do diluidor e homogeneização com bastão de vidro.....	222
Figura 4	Diluição do sêmen.....	223
Figura 4.1	Bisnagas contendo o diluidor no banho maria previamente preparado para as coletas e processamento do sêmen.....	223
Figura 4.2	Diluição do sêmen.....	223
Figura 5	Rediluição de sêmen.....	224
Figura 5.1	Balcão refrigerador utilizado para a rediluição do sêmen.....	224
Figura 5.2	Rediluição do sêmen hiperconcentrado.....	224
Figura 6	Procedimentos relacionados às fêmeas.....	225
Figura 6.1	Fêmeas selecionadas marcadas na gestação.....	225
Figura 6.2	Fêmeas prontas para as inseminações.....	225
Figura 6.3	Fêmea sendo inseminada.....	226

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Tamanho dos testículos em relação à idade do varrão.....	45
Tabela 2	Parâmetros seminais mínimos de qualidade I	57
Tabela 3	Parâmetros seminais mínimos de qualidade II.....	58
Tabela 4	Fontes de contaminação bacteriana do sêmen suíno diluído.....	82
Tabela 5	Práticas recomendadas para minimizar a contaminação bacteriana do ejaculado.....	83
Tabela 6	Diferenças observadas no IDC entre diferentes raças e seus cruzamentos.....	106
Tabela 7	Dados meteorológicos referentes à região de Brasília durante o período experimental.....	116
Tabela 8	Teores nutricionais da ração fornecida aos reprodutores durante o período experimental.....	121
Tabela 9	Composição do diluidor glicina-gema de ovo (Foote, 2002).....	123
Tabela 10	Teores nutricionais da ração fornecida às fêmeas gestantes até os 75 dias de gestação.....	129
Tabela 11	Teores nutricionais da ração fornecida às fêmeas gestantes a partir dos 76 dias de gestação.....	129
Tabela 12	Teores nutricionais da ração fornecida às fêmeas durante o IDC (flushing).....	130
Tabela 13	Distribuição da frequência de utilização da dupla de machos no experimento I entre os tratamentos.....	133
Tabela 14	Valores de p para os tratamentos, período de armazenamento e interação tratamento x período de armazenamento para a motilidade do sêmen.....	133
Tabela 15	Comportamento da motilidade espermática no sêmen diluído, resfriado a 5°C e armazenado em contêiner especial, oriundo de doses heterospérmicas hiperconcentradas (15×10^9 espermatozoides/dose), antes e após a rediluição para doses padrão ou de doses heterospérmicas padrão (3×10^9 espermatozoides/dose) avaliadas em diferentes períodos de tempo após a coleta.....	134
Tabela 16	Comportamento do vigor espermático no sêmen diluído, resfriado e armazenado em contêiner especial, oriundo de doses heterospérmicas hiperconcentradas (15×10^9 espermatozoides/dose), antes e após a rediluição para doses padrão ou de doses heterospérmicas padrão (3×10^9 espermatozoides/dose) avaliadas em diferentes períodos de tempo após a coleta.....	136

Tabela 17	Características espermáticas da porção um (primeiros 15mL) do sêmen heterospérmico oriundo de dois varrões submetidos à coleta fracionada, bem como o seu rendimento quanto ao número de fêmeas inseminadas.....	138
Tabela 18	Parâmetros de controle de fêmeas inseminadas com sêmen diluído e resfriado, oriundo de doses heterospérmicas hiperconcentradas (15×10^9 espermatozoides/dose de 100 mL) e rediluídas após 12 horas de armazenamento a 5°C, para doses padrão, antes das inseminações artificiais ou de doses heterospérmicas padrão (3×10^9 espermatozoides/dose de 100 mL).....	144
Tabela 19	Comportamento do cio, fertilidade e prolificidade de fêmeas suínas inseminadas com sêmen diluído e resfriado, oriundo de doses heterospérmicas hiperconcentradas (15×10^9 espermatozoides/dose) e rediluídas após 12 horas de armazenamento à 5°C, para doses padrão, para as inseminações artificiais ou de doses heterospérmicas padrão (3×10^9 espermatozoides/dose de 100 mL).....	145
Tabela 20	Distribuição da frequência de utilização das duplas de varrões entre os tratamentos para o experimento II.....	151
Tabela 21	Valores de p para os tratamentos, período de armazenamento do sêmen e para a interação tratamento x período de armazenamento sobre a motilidade do sêmen.....	151
Tabela 22	Comportamento da motilidade espermática do sêmen diluído, resfriado a 5°C e armazenado em contêiner especial, oriundo de doses heterospérmicas hiperconcentradas (24×10^9 espermatozoides/dose), antes e após a rediluição para doses padrão ou de doses heterospérmicas padrão (3×10^9 espermatozoides/dose) avaliadas em diferentes períodos após a coleta do sêmen.....	152
Tabela 23	Comportamento do vigor espermático no sêmen diluído, resfriado à 5°C e armazenado em contêiner especial, oriundo de doses heterospérmicas hiperconcentradas (24×10^9 de espermatozoides/dose), antes e após a rediluição para doses padrão ou de doses heterospérmicas padrão (3×10^9 espermatozoides/dose) avaliadas à diferentes períodos de tempo após a coleta.....	155
Tabela 24	Características espermáticas da porção um (primeiros 15mL) do sêmen heterospérmico oriundo de dois varrões submetidos à coleta fracionada, bem como o seu rendimento quanto ao número de fêmeas inseminadas – Experimento II.....	159

Tabela 25	Parâmetros de controle de fêmeas inseminadas com sêmen diluído e resfriado, oriundo de doses heterospérmicas hiperconcentradas (24×10^9 espermatozoides/dose) e rediluídas após 12 horas de armazenamento a 5°C , para doses padrão, antes das inseminações artificiais ou de doses heterospérmicas padrão (3×10^9 espermatozoides/dose).....	164
Tabela 26	Comportamento do cio, fertilidade e prolificidade de fêmeas suínas inseminadas com sêmen diluído e resfriado, oriundo de doses heterospérmicas hiperconcentradas (24×10^9 espermatozoides/dose) e rediluídas após 12 horas de armazenamento à 5°C , para doses padrão para as inseminações artificiais ou de doses heterospérmicas padrão (3×10^9 espermatozoides/dose inseminante).....	166

LISTA DE ANÁLISES ESTATÍSTICAS

I	Análises estatísticas referentes ao experimento I	227
Ia	Análises estatísticas referentes à tabela 15	227
Análise 1	Distribuição da utilização dos machos entre os tratamentos no experimento I	227
Análise 2	Comparação da motilidade espermática entre os tratamentos de acordo com o momento (arcsen V%).....	227
Análise 3	Comparação da motilidade espermática entre os tratamentos nos diferentes momentos de avaliação no experimento I.....	227
Análise 4	Avaliação da motilidade espermática independentemente do tratamento de acordo com o momento de avaliação no experimento I.....	228
Ib	Análises estatísticas referentes à tabela 16.....	228
Análise 5	Comparação do vigor espermático entre os tratamentos nos diferentes momentos de avaliação no experimento I.....	228
Análise 6	Comparação do vigor espermático independentemente do tratamento nos diferentes momentos de avaliação no experimento I.....	228
Análise 7	Comparação do vigor espermático entre o tempo 0 hora e o sêmen fresco dentro do tratamento 1 (Teste Wilcoxon).....	229
Análise 8	Comparação do vigor espermático entre o tempo 0 hora e o tempo 12 horas dentro do tratamento 1 (Teste Wilcoxon).....	229
Análise 9	Comparação do vigor espermático entre o tempo 0 horas e o sêmen rediluído dentro do tratamento 1 (Teste Wilcoxon).....	229
Análise 10	Comparação do vigor espermático entre o tempo 0 hora e o tempo 24 horas dentro do tratamento 1 (Teste Wilcoxon)	229
Análise 11	Comparação do vigor espermático entre o tempo 0 horas e o tempo 36 horas dentro do tratamento 1 (Teste Wilcoxon)	229
Análise 12	Comparação do vigor espermático entre o tempo 12 horas e o sêmen a fresco dentro do tratamento 1 (Teste Wilcoxon)	229
Análise 13	Comparação do vigor espermático entre o tempo 12 horas e o sêmen rediluído dentro do tratamento 1 (Teste Wilcoxon)	229
Análise 14	Comparação do vigor espermático entre o tempo 12 horas e o tempo 24 horas dentro do tratamento 1 (Teste Wilcoxon)	230
Análise 15	Comparação do vigor espermático entre o tempo 12 horas e o tempo 36 horas dentro do tratamento 1 (Teste Wilcoxon)	230
Análise 16	Comparação do vigor espermático entre o sêmen a fresco e o rediluído dentro do tratamento 1 (Teste Wilcoxon)	230
Análise 17	Comparação do vigor espermático entre o tempo 24 horas e o sêmen a fresco dentro do tratamento 1 (Teste Wilcoxon)	230

Análise 18	Comparação do vigor espermático entre o tempo 36 horas e o sêmen a fresco dentro do tratamento 1 (Teste Wilcoxon)	230
Análise 19	Comparação do vigor espermático entre o tempo 24 horas e o sêmen rediluído dentro do tratamento 1 (Teste Wilcoxon)	230
Análise 20	Comparação do vigor espermático entre o tempo 36 horas e o sêmen rediluído dentro do tratamento 1 (Teste Wilcoxon)	230
Análise 21	Comparação do vigor espermático entre o tempo 24 horas e o tempo 36 horas dentro do tratamento 1 (Teste Wilcoxon)	231
Análise 22	Comparação do vigor espermático entre o tempo 0 horas e o sêmen a fresco dentro do tratamento 2 (Teste Wilcoxon)	231
Análise 23	Comparação do vigor espermático entre o tempo 12 horas e o sêmen a fresco dentro do tratamento 2 (Teste Wilcoxon)	231
Análise 24	Comparação do vigor espermático entre o tempo 24 horas e o sêmen a fresco dentro do tratamento 2 (Teste Wilcoxon)	231
Análise 25	Comparação do vigor espermático entre o tempo 36 horas e o sêmen a fresco dentro do tratamento 2 (Teste Wilcoxon)	231
Análise 26	Comparação do vigor espermático entre o tempo 0 horas e o tempo 12 horas dentro do tratamento 2 (Teste Wilcoxon)	231
Análise 27	Comparação do vigor espermático entre o tempo 12 horas e o tempo 24 horas dentro do tratamento 2 (Teste Wilcoxon)	231
Análise 28	Comparação do vigor espermático entre o tempo 12 horas e o tempo 36 horas dentro do tratamento 2 (Teste Wilcoxon)	231
Análise 29	Comparação do vigor espermático entre o tempo 0 hora e o tempo 24 horas dentro do tratamento 2 (Teste Wilcoxon)	232
Análise 30	Comparação do vigor espermático entre o tempo 0 hora e o tempo 36 horas dentro do tratamento 2 (Teste Wilcoxon)	232
Análise 31	Comparação do vigor espermático entre o tempo 24 horas e o tempo 36 horas dentro do tratamento 2 (Teste Wilcoxon)	232
Análise 32	Comparação do vigor espermático entre os tratamentos para o sêmen a fresco no experimento I (Teste Wilcoxon)	232
Análise 33	Comparação do vigor espermático entre os tratamentos para o sêmen no tempo 0 hora no experimento I (Teste Wilcoxon)	232
Análise 34	Comparação do vigor espermático entre os tratamentos para o sêmen no tempo 12 horas no experimento I (Teste Wilcoxon)	232
Análise 35	Comparação do vigor espermático entre os tratamentos para o sêmen no tempo 24 horas no experimento I (Teste Wilcoxon)	232
Análise 36	Comparação do vigor espermático entre os tratamentos para o sêmen no tempo 36 horas no experimento I (Teste Wilcoxon)	232
Ic	Análises estatísticas referentes à tabela 17	233

Análise 37	Comparação da motilidade espermática entre os tratamentos no experimento I (Teste t).....	233
Análise 38	Comparação da motilidade espermática transformada (arsen V%) entre os tratamentos no experimento I (teste t)	233
Análise 39	Comparação do número de espermatozoides totais ($\times 10^6$) por mL da P1 entre os tratamentos no experimento I	233
Análise 40	Comparação do número de espermatozoides móveis ($\times 10^6$) por mL da P1 entre os tratamentos no experimento I	233
Análise 41	Comparação do número de espermatozoides totais ($\times 10^9$) da P1 entre os tratamentos no experimento I	233
Análise 42	Comparação do número de espermatozoides móveis ($\times 10^9$) da P1 entre os tratamentos no experimento I	233
Análise 43	Comparação do volume de sêmen entre os tratamentos no experimento I	233
Análise 44	Comparação do volume de diluidor entre os tratamentos no experimento I	234
Análise 45	Comparação do número de espermatozoides totais por dose entre os tratamentos no experimento I.	234
Análise 46	Comparação do número de espermatozoides móveis por dose entre os tratamentos no experimento I	234
Análise 47	Comparação do número de doses produzidas entre tratamentos no experimento I	234
Análise 48	Comparação do número real de fêmeas inseminadas entre tratamentos no experimento I	234
Id	Análises estatísticas referentes à tabela 18	234
Análise 49	Comparação do número total de inseminações entre os tratamentos no experimento I (Teste t)	234
Análise 50	Comparação do intervalo da coleta de sêmen à primeira inseminação artificial entre os tratamentos no experimento I	235
Análise 51	Comparação do intervalo do início do cio à primeira inseminação entre os tratamentos no experimento I	235
Análise 52	Comparação da motilidade espermática entre os tratamentos na primeira inseminação no experimento I	235
Análise 53	Comparação da motilidade espermática transformada (arsen V%) entre os tratamentos na primeira inseminação no experimento I	235
Análise 54	Comparação da duração da primeira inseminação entre os tratamentos no experimento I	235
Análise 55	Intervalos da coleta de sêmen à rediluição e da rediluição à primeira inseminação no experimento I	235

Análise 56	Distribuição da utilização das duplas de machos entre os tratamentos na primeira inseminação no experimento I	236
Análise 57	Comparação do vigor espermático entre os tratamentos na primeira inseminação.....	236
Análise 58	Comparação do intervalo da coleta do sêmen à segunda inseminação entre os tratamentos no experimento I	236
Análise 59	Comparação do intervalo do início do cio à segunda inseminação entre os tratamentos no experimento I	236
Análise 60	Comparação do intervalo entre a primeira e a segunda inseminações entre os tratamentos no experimento I	236
Análise 61	Comparação da motilidade espermática entre os tratamentos na segunda inseminação no experimento I	236
Análise 62	Comparação da motilidade espermática transformada (arcsen V%) entre os tratamentos na segunda inseminação no experimento I.....	236
Análise 63	Comparação da duração da segunda inseminação entre os tratamentos no experimento I	237
Análise 64	Intervalos da coleta de sêmen à rediluição e da rediluição do sêmen à segunda inseminação no experimento I.....	237
Análise 65	Distribuição da utilização das duplas de machos entre os tratamentos na segunda inseminação no experimento I	237
Análise 66	Comparação do vigor espermático entre os tratamentos na segunda inseminação no experimento I (Teste Wilcoxon)	237
Análise 67	Comparação do intervalo da coleta do sêmen à terceira inseminação entre os tratamentos no experimento I (Teste t)	237
Análise 68	Comparação do intervalo do início do cio à terceira inseminação entre os tratamentos no experimento I (Teste t)	237
Análise 69	Comparação do intervalo entre a segunda e a terceira inseminações entre os tratamentos no experimento I (Teste t)	238
Análise 70	Comparação da motilidade espermática entre os tratamentos na terceira inseminação no experimento I (Teste t)	238
Análise 71	Comparação da motilidade espermática transformada (arcsen V%) entre os tratamentos na terceira inseminação no experimento I (Teste t).....	238
Análise 72	Comparação da duração da terceira inseminação entre os tratamentos no experimento I (Teste t)	238
Análise 73	Comparação do intervalo entre a terceira inseminação e o final do cio entre os tratamentos no experimento I (Teste t)	238
Análise 74	Intervalos da coleta de sêmen à rediluição e da rediluição à terceira inseminação no experimento I	238

Análise 75	Distribuição da utilização das duplas de machos entre os tratamentos na terceira inseminação no experimento I	239
Análise 76	Comparação do vigor espermático na terceira inseminação entre os tratamentos no experimento I (Teste Wilcoxon)	239
Análise 77	Comparação do intervalo da coleta do sêmen à quarta inseminação entre os tratamentos no experimento I (Teste t)	239
Análise 78	Comparação do intervalo do início do cio à quarta inseminação entre os tratamentos no experimento I (Teste t)	239
Análise 79	Comparação do intervalo entre a terceira e a quarta inseminações entre os tratamentos no experimento I (Teste t)	239
Análise 80	Comparação da motilidade espermática entre os tratamentos na quarta inseminação no experimento I (Teste t)	239
Análise 81	Comparação da motilidade espermática transformada (arcsen V%) entre os tratamentos na quarta inseminação no experimento I (Teste t)	239
Análise 82	Comparação da duração da quarta inseminação entre os tratamentos no experimento I (Teste t)	240
Análise 83	Comparação do intervalo da quarta inseminação ao final do cio entre os tratamentos no experimento I (Teste t)	240
Análise 84	Intervalos da coleta de sêmen à rediluição e da rediluição à quarta inseminação no experimento I	240
Análise 85	Distribuição da utilização das duplas de machos entre os tratamentos na quarta inseminação no experimento I	240
Análise 86	Comparação do vigor espermático na quarta inseminação entre os tratamentos no experimento I (Teste Wilcoxon).....	240
Análise 87	Comparação do intervalo da última inseminação ao final do cio no experimento I (Teste t)	240
Análise 88	Comparação do vigor espermático entre os tratamentos na primeira inseminação no experimento I (Teste t)	241
Análise 89	Comparação do vigor espermático entre os tratamentos na segunda inseminação no experimento I (Teste t)	241
Análise 90	Comparação do vigor espermático entre os tratamentos na terceira inseminação no experimento I (Teste t)	241
Análise 91	Comparação do vigor espermático entre os tratamentos na quarta inseminação no experimento I (Teste t)	241
Ie	Análises estatísticas referentes à tabela 19	241
Análise 92	Comparação do número de inseminações entre os tratamentos no experimento I (Teste t)	241
Análise 93	Comparação do IDC das fêmeas entre os tratamentos no experimento I (Teste t)	241

Análise 94	Comparação da duração do estro das fêmeas entre os tratamentos no experimento I (Teste t)	242
Análise 95	Análise do número de dias de retorno ao cio nos tratamentos no experimento I (Teste t)	242
Análise 96	Intervalo da última inseminação ao retorno ao cio nos dois tratamentos no experimento I (Teste t)	242
Análise 97	Comparação do número de leitões nascidos vivos entre os dois tratamentos no experimento I (Teste t)	242
Análise 98	Comparação do número de leitões natimortos entre os dois tratamentos no experimento I (Teste t)	242
Análise 99	Comparação do número de leitões mumificados entre os dois tratamentos no experimento I (Teste t)	242
Análise 100	Comparação do número de leitões nascidos totais entre os dois tratamentos no experimento I (Teste t)	242
Análise 101	Comparação das taxas de gestação entre os tratamentos	243
II	Análises estatísticas referentes ao Experimento II	243
IIa	Análises estatísticas referentes à tabela 22	243
Análise 102	Distribuição da utilização dos machos entre os tratamentos no experimento II	243
Análise 103	Comparação da motilidade espermática entre os tratamentos de acordo com o momento (arcsen V%) no experimento II	243
Análise 104	Comparação da motilidade espermática entre os tratamentos no experimento II	243
Análise 105	Comparação da motilidade espermática entre os tratamentos nos diferentes momentos de avaliação no experimento II.....	244
IIb	Análises estatísticas referentes à tabela 23	244
Análise 106	Comparação do vigor espermático entre os tratamentos de acordo com o momento no experimento II	244
Análise 107	Comparação do vigor espermático entre os tratamentos nos diferentes momentos no experimento II (Teste Wilcoxon)	244
Análise 108	Comparação do vigor espermático entre o tempo 0 hora e o sêmen fresco dentro do tratamento 1 (Teste Wilcoxon)	244
Análise 109	Comparação do vigor espermático entre o tempo 12 horas e o sêmen fresco dentro do tratamento 1 (Teste Wilcoxon)	245
Análise 110	Comparação do vigor espermático entre o sêmen fresco e o sêmen rediluído dentro do tratamento 1 (Teste Wilcoxon)	245
Análise 111	Comparação do vigor espermático entre o tempo 24 horas e o sêmen fresco dentro do tratamento 1 (Teste Wilcoxon)	245

Análise 112	Comparação do vigor espermático entre o tempo 36 horas e o sêmen fresco dentro do tratamento 1 (Teste Wilcoxon)	245
Análise 113	Comparação do vigor espermático entre o tempo 0 hora e o tempo 12 horas dentro do tratamento 1 (Teste Wilcoxon)	245
Análise 114	Comparação do vigor espermático entre o tempo 0 hora e o sêmen rediluído dentro do tratamento 1 (Teste Wilcoxon)	245
Análise 115	Comparação do vigor espermático entre o tempo 0 hora e o tempo 24 horas dentro do tratamento 1 (Teste Wilcoxon)	245
Análise 116	Comparação do vigor espermático entre o tempo 0 hora e o tempo 36 horas dentro do tratamento 1 (Teste Wilcoxon)	245
Análise 117	Comparação do vigor espermático entre o tempo 12 horas e o sêmen rediluído dentro do tratamento 1 (Teste Wilcoxon)	246
Análise 118	Comparação do vigor espermático entre o tempo 12 horas e o tempo 24 horas dentro do tratamento 1 (Teste Wilcoxon)	246
Análise 119	Comparação do vigor espermático entre o tempo 12 horas e o tempo 36 horas dentro do tratamento 1 (Teste Wilcoxon)	246
Análise 120	Comparação do vigor espermático entre o tempo 24 horas e o sêmen rediluído dentro do tratamento 1 (Teste Wilcoxon)	246
Análise 121	Comparação do vigor espermático entre o tempo 36 horas e o sêmen rediluído dentro do tratamento 1 (Teste Wilcoxon)	246
Análise 122	Comparação do vigor espermático entre o tempo 24 horas e o tempo 36 horas dentro do tratamento 1 (Teste Wilcoxon)	246
Análise 123	Comparação do vigor espermático entre o tempo 0 hora e o sêmen fresco dentro do tratamento 2 (Teste Wilcoxon)	246
Análise 124	Comparação do vigor espermático entre o tempo 12 horas e o sêmen fresco dentro do tratamento 2 (Teste Wilcoxon)	246
Análise 125	Comparação do vigor espermático entre o tempo 24 horas e o sêmen fresco dentro do tratamento 2 (Teste Wilcoxon)	247
Análise 126	Comparação do vigor espermático entre o tempo 36 horas e o sêmen fresco dentro do tratamento 2 (Teste Wilcoxon)	247
Análise 127	Comparação do vigor espermático entre o tempo 0 hora e o tempo 12 horas dentro do tratamento 2 (Teste Wilcoxon)	247
Análise 128	Comparação do vigor espermático entre o tempo 0 hora e o tempo 24 horas dentro do tratamento 2 (Teste Wilcoxon)	247
Análise 129	Comparação do vigor espermático entre o tempo 0 hora e o tempo 36 horas dentro do tratamento 2 (Teste Wilcoxon)	247
Análise 130	Comparação do vigor espermático entre o tempo 12 horas e o tempo 24 horas dentro do tratamento 2 (Teste Wilcoxon)	247

Análise 131	Comparação do vigor espermático entre o tempo 12 horas e o tempo 36 horas dentro do tratamento 2 (Teste Wilcoxon)	247
Análise 132	Comparação do vigor espermático entre o tempo 24 horas e o tempo 36 horas dentro do tratamento 2 (Teste Wilcoxon)	247
Análise 133	Comparação do vigor espermático entre os tratamentos para o sêmen a fresco no experimento II (Teste Wilcoxon)	248
Análise 134	Comparação do vigor espermático entre os tratamentos para o sêmen no tempo 0h no experimento II (Teste Wilcoxon)	248
Análise 135	Comparação do vigor espermático entre os tratamentos para o sêmen no tempo 12 horas no experimento II (Teste Wilcoxon)	248
Análise 136	Comparação do vigor espermático entre os tratamentos para o sêmen no tempo 24 horas no experimento II (Teste Wilcoxon)	248
Análise 137	Comparação do vigor espermático entre os tratamentos para o sêmen no tempo 36 horas no experimento II (Teste Wilcoxon)	248
IIc	Análises estatísticas referentes à tabela 24	248
Análise 138	Comparação da motilidade espermática entre os tratamentos no experimento II (Teste t)	248
Análise 139	Comparação da motilidade espermática transformada ($\arcsen V\%$) entre os tratamentos no experimento II (Teste t).....	248
Análise 140	Comparação do número de espermatozoides totais ($\times 10^6$) por mL da P1 entre os tratamentos no experimento II (Teste t)	249
Análise 141	Comparação do número de espermatozoides móveis ($\times 10^6$) por mL da P1 entre os tratamentos no experimento II (Teste t)	249
Análise 142	Comparação do número de espermatozoides totais ($\times 10^9$) da P1 entre os tratamentos no experimento II (Teste t)	249
Análise 143	Comparação do número de espermatozoides móveis ($\times 10^9$) da P1 entre os tratamentos no experimento II (Teste t)	249
Análise 144	Comparação do volume de sêmen entre os tratamentos no experimento II (Teste t)	249
Análise 145	Comparação do volume de diluidor utilizado entre os tratamentos no experimento II (Teste t)	249
Análise 146	Comparação do número de espermatozoides totais por dose inseminante entre os tratamentos no experimento II (Teste t)	249
Análise 147	Comparação do número de espermatozoides móveis por dose inseminante entre os tratamentos no experimento II (Teste t)	250
Análise 148	Comparação do número de doses inseminantes produzidas entre tratamentos no experimento II (Teste t)	250
Análise 149	Comparação do número real de fêmeas inseminadas entre os tratamentos no experimento II (Teste t)	250

IId	Análises estatísticas referentes à tabela 25	250
Análise 150	Comparação do número total de inseminações entre os tratamentos no experimento II (Teste t)	250
Análise 151	Comparação do intervalo da coleta de sêmen à primeira inseminação artificial entre os tratamentos no experimento II (Teste t)	250
Análise 152	Comparação do intervalo do início do cio à primeira inseminação entre os tratamentos no experimento II (Teste t)	250
Análise 153	Comparação da motilidade espermática entre os tratamentos na primeira inseminação no experimento II (Teste t)	251
Análise 154	Comparação da motilidade espermática transformada (arcsen V%) entre os tratamentos na primeira inseminação no experimento II (Teste t)	251
Análise 155	Comparação da duração da primeira inseminação entre os tratamentos no experimento II (Teste t)	251
Análise 156	Intervalos da coleta de sêmen à rediluição e da rediluição à primeira inseminação no experimento II	251
Análise 157	Distribuição da utilização das duplas de machos entre os tratamentos na primeira inseminação no experimento II	251
Análise 158	Comparação do vigor entre os tratamentos na primeira inseminação no experimento II (Teste Wilcoxon)	251
Análise 159	Comparação do intervalo da coleta de sêmen à segunda inseminação artificial entre os tratamentos no experimento II (Teste t)	251
Análise 160	Comparação entre o intervalo do início do cio à segunda inseminação artificial entre os tratamentos no experimento II (Teste t)	252
Análise 161	Comparação do intervalo entre a primeira e a segunda inseminações entre os tratamentos no experimento II (Teste t)	252
Análise 162	Comparação da motilidade espermática entre os tratamentos na segunda inseminação no experimento II (Teste t)	252
Análise 163	Comparação da motilidade espermática transformada (arcsen V%) entre os tratamentos na segunda inseminação no experimento II (Teste t)	252
Análise 164	Comparação da duração da segunda inseminação entre os tratamentos no experimento II (Teste t)	252
Análise 165	Intervalos da coleta de sêmen à rediluição e da rediluição do sêmen à segunda inseminação no experimento II	252
Análise 166	Distribuição da utilização das duplas de machos entre os tratamentos na segunda inseminação no experimento II	252
Análise 167	Comparação do vigor espermático entre os tratamentos na segunda inseminação no experimento II (Teste Wilcoxon)	253
Análise 168	Comparação do intervalo da coleta do sêmen à terceira inseminação entre os tratamentos no experimento II (Teste t)	253

Análise 169	Comparação do intervalo do início do cio à terceira inseminação entre os tratamentos no experimento II (Teste t)	253
Análise 170	Comparação do intervalo entre a segunda e a terceira inseminações entre os tratamentos no experimento II (Teste t)	253
Análise 171	Comparação da motilidade espermática entre os tratamentos na terceira inseminação no experimento II (Teste t)	253
Análise 172	Comparação da motilidade espermática transformada (arcsen V%) entre os tratamentos na terceira inseminação no experimento II (Teste t)	253
Análise 173	Comparação da duração da terceira inseminação entre os tratamentos no experimento II (Teste t)	253
Análise 174	Comparação do intervalo entre a terceira inseminação e o final do cio entre os tratamentos no experimento II (Teste t)	254
Análise 175	Intervalos da coleta de sêmen à rediluição e da rediluição à terceira inseminação no experimento II	254
Análise 176	Distribuição da utilização das duplas de machos entre os tratamentos na terceira inseminação no experimento II	254
Análise 177	Comparação do vigor espermático na terceira inseminação entre os tratamentos no experimento II (Teste Wilcoxon)	254
Análise 178	Comparação do intervalo da coleta do sêmen à quarta inseminação entre os tratamentos no experimento I (Teste t)	254
Análise 179	Comparação do intervalo do início do cio à quarta inseminação entre os tratamentos no experimento II (Teste t)	254
Análise 180	Comparação do intervalo entre a terceira e a quarta inseminação entre os tratamentos no experimento II (Teste t)	254
Análise 181	Comparação da motilidade espermática entre os tratamentos na quarta inseminação no experimento II (Teste t)	255
Análise 182	Comparação da motilidade espermática transformada (arcsen V%) entre os tratamentos na quarta inseminação no experimento II (Teste t)	255
Análise 183	Comparação da duração da quarta inseminação entre os tratamentos no experimento II (Teste t)	255
Análise 184	Comparação do intervalo da quarta inseminação ao final do cio entre os tratamentos no experimento II (Teste t)	255
Análise 185	Intervalos da coleta de sêmen à rediluição e da rediluição à quarta inseminação no experimento II	255
Análise 186	Distribuição da utilização das duplas de machos entre os tratamentos na quarta inseminação no experimento II	255
Análise 187	Comparação do vigor espermático na quarta inseminação entre os tratamentos no experimento II (Teste t)	255

Análise 188	Comparação do intervalo da última inseminação ao final do cio no experimento II (Teste t)	256
Análise 189	Comparação do vigor espermático entre os tratamentos na primeira inseminação no experimento II (Teste t)	256
Análise 190	Comparação do vigor espermático entre os tratamentos na segunda inseminação no experimento II (Teste t)	256
Análise 191	Comparação do vigor espermático entre os tratamentos na terceira inseminação no experimento II (Teste t)	256
Análise 192	Comparação do vigor espermático entre os tratamentos na quarta inseminação no experimento II (Teste t)	256
Ile	Análises estatísticas referentes à tabela 26	256
Análise 193	Comparação do número de inseminações entre os tratamentos no experimento II (Teste t)	256
Análise 194	Comparação do IDC das fêmeas entre os tratamentos no experimento II (Teste t)	257
Análise 195	Comparação da duração do estro das fêmeas entre os tratamentos no experimento II (Teste t)	257
Análise 196	Comparação do número de leitões nascidos vivos entre os dois tratamentos no experimento II (Teste t)	257
Análise 197	Comparação do número de leitões natimortos entre os dois tratamentos no experimento II (Teste t)	257
Análise 198	Comparação entre o número de leitões mumificados entre os dois tratamentos no experimento II (Teste t)	257
Análise 199	Comparação do número de leitões nascidos totais entre os dois tratamentos no experimento II (Teste t)	257
Análise 200	Comparação das taxas de gestação entre os tratamentos no experimento II	258

RESUMO

Visando otimizar o transporte de doses inseminantes resfriadas em contêiner especial, para a inseminação artificial de fêmeas suínas em granjas comerciais, utilizou-se a hiperconcentração do sêmen heterospérmico de varrões com 15 bilhões (experimento I) ou com 24 bilhões (experimento II) de espermatozoides móveis/dose de 100 mL. Para tal, utilizou-se o sêmen oriundo da coleta dos primeiros 15 mL do ejaculado (P1) de dois varrões (30 mL), diluído em diluidor glicina-gema de ovo (Foote, 2002), sendo resfriado à 5°C em contêiner especial e rediluído para doses padrão de 3 bilhões de espermatozoides móveis, após 12 horas de armazenamento. Além disso, o sêmen foi armazenado por até 24 horas após a sua rediluição. Avaliou-se, nos dois experimentos, a manutenção das características físicas do sêmen mensuradas à diferentes períodos de armazenamento (sêmen a fresco, zero horas, 12 horas, rediluído, 24 horas e 36 horas), e o desempenho reprodutivo dos varrões, bem como a sua fertilidade, quando da inseminação de fêmeas primíparas. Nos dois experimentos foram realizados dois tratamentos: E1T1-15B) fêmeas suínas inseminadas com sêmen oriundo de doses heterospérmicas hiperconcentradas (15×10^9 espermatozoides móveis/dose), rediluídas após 12 horas de armazenamento a 5°C para doses padrão de 3×10^9 de espermatozoides móveis/dose, e armazenadas a 5°C por até 24 horas após a rediluição (n=10); E1T2-3B) fêmeas suínas inseminadas com doses heterospérmicas padrão (3×10^9 espermatozoides móveis/dose), armazenadas a 5°C por até 36 horas após a coleta (n=10); E2T1-24B) fêmeas suínas inseminadas com sêmen oriundo de doses heterospérmicas hiperconcentradas (24×10^9 de espermatozoides móveis/dose), rediluídas após 12 horas de armazenamento a 5°C para doses padrão de 3×10^9 espermatozoides móveis/dose, armazenadas a 5°C por até 24 horas após a rediluição (n=10); E2T2-3B) fêmeas suínas inseminadas com doses heterospérmicas padrão (3×10^9 espermatozoides móveis/dose), armazenadas a 5°C por até 36 horas após a coleta (n=10). No experimento I, não houve efeito ($p > 0,05$) dos tratamentos sobre a motilidade espermática, embora tenha havido queda acentuada ($p < 0,05$) dos seus valores às 12 horas de armazenamento, que no entanto se mantiveram acima de 70% até as 36 horas. Quanto ao vigor espermático, houve efeito dos tratamentos no tempo zero hora ($p < 0,05$), quando o vigor do T1 foi superior. Além disso, houve efeito do período de armazenamento para os dois tratamentos, havendo queda progressiva ao longo das 36 horas de armazenamento, embora nem sempre as diferenças observadas tenham sido significativas. As taxas de gestação (90%) e o número total de leitões nascidos (15,11 – E1T1-15B; 13,44 – E1T2-3B) não diferiram ($p > 0,05$) entre os tratamentos no experimento I. No experimento II, não houve efeito dos tratamentos ($p > 0,05$) sobre a motilidade e o vigor espermáticos. No entanto, houve queda da motilidade ($p < 0,05$) já às 12 horas de armazenamento, e ao longo de todo o período de estocagem, das 12 às 36 horas. Quanto ao vigor espermático, para o E2T1-24B não houve efeito da rediluição até às 36 horas sobre os seus valores, embora o vigor às 36 horas tenha diferido ($p < 0,05$) do observado às 12 horas (pré-rediluição). No E2T2-3B houve manutenção do vigor de 12 até as 36 horas de estocagem, sendo que os valores observados às 36 horas só diferiram ($p < 0,05$) dos observados no sêmen a fresco e quando da avaliação às zero horas. Observou-se também neste experimento queda progressiva do vigor, embora nem sempre as diferenças tenham sido significativas. As taxas de gestação (100% vs 80%) e o número total de leitões nascidos (14,00 vs 16,50), respectivamente, para os tratamentos 1 e 2 do experimento II, não diferiram ($p > 0,05$) entre si. Concluiu-se, então, que a hiperconcentração do sêmen para 15 ou 24 bilhões de espermatozoides/dose, armazenadas à 5°C por 12 horas não resultou em prejuízos quanto à manutenção das características físicas do sêmen

e desempenho reprodutivo dos varrões, sendo capaz de manter a taxa de gestação e a prolificidade das fêmeas inseminadas, dentro de valores comercialmente aceitáveis.

Palavras chave: suíno, sêmen heterospérmico, coleta fracionada, resfriamento, transporte

ABSTRACT

The hyperconcentration of heterospermic semen of boars containing 15 billion (experiment I) or 24 billion (experiment II) of mobile spermatozoa per 100mL dose was studied aiming to optimize the transport of cooled semen stored in special container to be used in artificial insemination of sows in commercial hog farms. For that purpose, semen from the first 15mL of the ejaculate (P1) obtained from two boars (30mL) was diluted in glycine-egg yolk diluter (Foote, 2002), cooled at 5°C in a special container and rediluted in standard doses of 3 billion mobile spermatozoa after 12h of storage. Semen was also stored up to 24h after redilution. In both experiments, the physical characteristics of the semen were evaluated at different storage periods (fresh, 0h, 12h, rediluted, 24h and 36h). The reproductive performance of the boars and their fertility regarding the insemination of primiparous sows were also determined. Two treatments were used in each experiment: E1T1-15B – sows inseminated with semen originated from hyperconcentrated heterospermic doses (15×10^9 mobile spermatozoa per dose), rediluted after 12h of storage at 5°C for standard doses of 3×10^9 mobile spermatozoa per dose and stored at 5°C up to 24h after redilution (n=10); E1T2-3B - sows inseminated with standard heterospermic doses (3×10^9 mobile spermatozoa per dose), stored at 5°C up to 36h after semen collection (n=10); E2T1-24B - sows inseminated with semen originated from hyperconcentrated heterospermic doses (24×10^9 mobile spermatozoa per dose), rediluted after 12h of storage at 5°C for standard doses of 3×10^9 mobile spermatozoa per dose and stored at 5°C up to 24h after redilution (n=10); and E2T2-3B - sows inseminated with standard heterospermic doses (3×10^9 mobile spermatozoa per dose), stored at 5°C up to 36h after collection (n=10). In experiment I, there was no effect ($p > 0.05$) of treatments on the spermatic motility, even though a pronounced decrease ($p < 0.05$) of their values at 12h of storage was recorded. However, they remained higher than 70% until 36h. There was effect of the treatments on the spermatic vigor at 0h ($p < 0.05$), when T1 vigor was higher. There was also effect of the storage period for both treatments, with a progressive decrease throughout the 36h of storage, although the differences were not always significant. Pregnancy rates (90%) and the number of total farrowed piglets (15.11 – E1T1-15B and 13.44 – E1T2-3B) did not differ ($p > 0.05$) between the treatments of the experiment I. In experiment II, there was no effect of treatments ($p > 0.05$) on the spermatic vigor and motility. However, there was a decrease of motility ($p < 0.05$) since at 12h of storage and throughout the storage period from 12 to 36h. There was no effect of redilution up to 36h on the values of spermatic vigor in E2T1-24B, although the value at 36h was differed ($p < 0.05$) of that recorded at 12h (previous to dilution). In E2T2-3B, the vigor was maintained from 12 to 36h of storage, and the values registered at 36h only differed ($p < 0.05$) from those observed in fresh semen and when evaluated at 0h. A progressive decrease of vigor was also observed in this experiment, although the differences were not always significant. The pregnant rates (100 vs. 80%) and the total number of farrowed piglets (14.00 vs. 16.50), respectively for the treatments 1 and 2 of the experiment II, were similar ($p > 0.05$). Then, it was concluded that the hyperconcentration of the semen to 15 or 24 billion of mobile spermatozoa per dose, stored at 5°C for 12h, did not result in drawbacks considering the physical characteristics of the semen and the reproductive performance of the boars, maintaining the pregnancy rates and prolificity of the inseminated sows within commercially acceptable values.

Key words: swine, heterospermatic semen, fractioned collection, cooling, transport

1. INTRODUÇÃO

A carne suína continua sendo a carne mais produzida no mundo. Em 2007, a Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) previu que 110,7 milhões de toneladas seriam produzidas globalmente comparadas com 86,2 milhões de toneladas na indústria do frango, 66,6 milhões de toneladas de carne bovina e 13,9 milhões de toneladas de carne de ovinos e caprinos (Hartley, 2007). Desta forma, a assistência técnica e científica à indústria de produção de suínos deverá continuar a prover grandes avanços tecnológicos e melhorias que reduzam os custos de produção. A aplicação destas tecnologias para a indústria de suínos da maior parte dos países aumentou a produtividade dos rebanhos significativamente, havendo então uma demanda constante de melhoramento tecnológico na genética, no controle de doenças, na conversão alimentar, etc. (Hartley, 2007).

Atualmente, o Brasil possui um rebanho de 34 milhões de cabeças e estima-se que 400 mil pessoas dependam diretamente da cadeia produtiva de suínos brasileira. O valor da cadeia produtiva no Brasil é estimada em 1,8 bilhões de dólares. Em 1970 o rebanho era de 31,5 milhões de cabeças, sendo a produção de 705 mil toneladas, e em 2006, com 32 milhões de cabeças, a produção aumentou para 2.825 milhões de toneladas. Desta forma, em 36 anos, o crescimento do rebanho foi de apenas 1,6% enquanto a produção cresceu 300%. Estes números mostram claramente a evolução tecnológica do setor, graças à importante contribuição da assistência técnica e dos criadores na área da genética, nutrição e manejo (Roppa, 2007).

Considerável atenção tem sido dada nos últimos anos ao desenvolvimento e/ou melhoramento de tecnologias reprodutivas emergentes visando aumentar a eficiência reprodutiva na produção de suínos. Dentre

estas, destacam-se algumas biotecnologias com potencial aplicação a campo em um curto período de tempo, como por exemplo, a inseminação artificial (IA) com pequeno número de espermatozoides, a criopreservação de sêmen e de embriões, a sexagem de espermatozoides e a transferência não cirúrgica de embriões.

A inseminação artificial é de grande importância para a produção de suínos, tendo ocorrido nos últimos 15 anos grande aumento em sua utilização a campo, na maioria dos países (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2005). Esta técnica tem permitido 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 (Phillipott, 1993).

As primeiras tentativas de inseminação artificial (IA) em suínos foram feitas em 1926 – 1927 por Ivanov, e continuadas entre 1930 – 1936 por Milovanov *et al.* (citado por Serdiuk, 1970). A utilização da inseminação artificial (IA) em suínos tem aumentado significativamente nos últimos anos em substituição à monta natural, por ser um procedimento barato, fácil e rápido, sendo frequentemente realizado pelos próprios produtores, com grande sucesso nos últimos anos (Vazquez *et al.*, 2008). A técnica é praticada, atualmente, em todo o mundo, tendo tido no Brasil, uma grande expansão a partir de 1975, embora os primeiros estudos tenham sido desenvolvidos já a partir de 1959. Entretanto, o verdadeiro crescimento com vasta utilização comercial da IA, na produção de suínos, não ocorreu até os anos 80 (Reed, 1985; Johnson *et al.*, 2000), quando os protocolos de inseminação foram padronizados.

Estima-se que sejam realizadas 1,6 milhões de inseminações, o que equivale à sua utilização em 51% das matrizes do plantel tecnificado nacional. Na última década, houve um aumento de 1.700% no emprego

da IA na suinocultura brasileira (Oberlender *et al.*, 2008). Deve-se enfatizar, ainda, que a utilização da inseminação artificial com sêmen diluído e resfriado em suínos triplicou nos últimos quinze anos. Em 85% das inseminações em suínos utiliza-se o sêmen no mesmo dia da coleta ou no dia seguinte, quando estocado a uma temperatura de conservação entre 16°C e 20°C (Johnson *et al.*, 2000).

A grande vantagem da IA é que o potencial genético dos melhores varrões pode ser transferido para um maior número de fêmeas, levando à melhoria genética dos plantéis. Além disso, esta tecnologia tem permitido a utilização de reprodutores selecionados e a disseminação de material genético pela importação de sêmen, além de reduzir problemas envolvendo os custos de transporte internacional de animais e as barreiras sanitárias.

A demanda por suínos de melhor qualidade, com maior rendimento de carcaça, juntamente com o aperfeiçoamento da técnica de IA, principalmente, o desenvolvimento de vários diluidores de sêmen, tanto para curtos como para longos períodos de estocagem, tem contribuído também para o aumento da utilização da IA (Rodríguez-Martinez *et al.*, 2005). Ressalta-se, ainda o desenvolvimento de melhores sistemas de transporte, fazendo com que o sêmen resfriado armazenado esteja disponível no mesmo ou nos próximos dias para uso em diferentes lugares no mundo. Vale ressaltar também que uma grande proporção dos criadores de suínos são inovadores e dispostos a experimentar novas tecnologias (Johnson *et al.*, 2000).

Gadea (2003) afirmou que 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 e com manutenção de uma fertilidade aceitável. Além disso, de acordo com o mesmo autor, a principal

limitação desta técnica é a redução da longevidade espermática no decorrer da estocagem, que varia de 1 a 5 dias.

Para Cameron (1998), uma das principais expectativas futuras, em relação ao uso da inseminação artificial em suínos, consiste no desenvolvimento de novas técnicas de armazenamento e transporte do sêmen a 15°C e a 5°C. Um aspecto importante a ser considerado nos procedimentos de IA é a necessidade do transporte do sêmen do local de coleta e processamento até o local onde as fêmeas serão inseminadas. Em se tratando de um país de grande extensão territorial como o Brasil, esse transporte pode levar mais de 24 horas. Nesse sentido, o sêmen deve ser coletado, processado e transportado de maneira a não ter sua fertilidade prejudicada.

Existem duas maneiras de conservar o sêmen suíno para transporte, o resfriamento (normalmente entre 15°C a 18°C) e o congelamento (Alkmin, 2010). Entretanto, a temperatura de armazenamento do sêmen suíno entre 15°C a 18°C não interrompe totalmente o metabolismo dos espermatozoides, que continuam produzindo metabólitos, que se acumulam e interferem com a manutenção da longevidade espermática. Além disso, essa temperatura não impede a multiplicação bacteriana, a qual pode afetar a qualidade do sêmen (Weitze, 1990a). Teoricamente, quanto mais baixa for a temperatura de armazenamento, menor seria o metabolismo e maior o tempo de armazenamento do sêmen.

Diante das restrições apresentadas anteriormente, pretende-se que o armazenamento do sêmen suíno a temperaturas próximas de 5°C seria uma vantagem, uma vez que o mesmo poderia permanecer estocado em refrigeradores domésticos comuns (Landsverk, 2000), o que seria conveniente para a maioria dos produtores. No entanto, os espermatozoides suínos são sensíveis à temperaturas

inferiores a 15°C, abaixo da qual há redução significativa da motilidade (De Leeuw *et al.*, 1990).

Há que se enfatizar, entretanto, que as vantagens da IA poderiam ser maximizadas se os espermatozoides fossem congelados, uma vez que se trata da melhor alternativa para a troca/distribuição a longas distâncias do melhor/mais desejado material genético (Roca *et al.*, 2006). O sêmen congelado poderia também ser usado para o estabelecimento de um banco genético para conservação da diversidade genética e até mesmo para reservar suprimentos genéticos, a serem utilizados quando ocorrerem surtos de doenças e/ou para a conservação de linhagens ameaçadas ou já em extinção. No entanto, vários fatores impedem o avanço desta biotecnologia, notadamente a baixa sobrevivência espermática pós-descongelamento (Larsson e Einarsson, 1976; Hernández *et al.*, 2007), associada a baixas taxas de parição e leitegadas de tamanho indesejável. Assim, esta tecnologia não tem sido uma opção comercial para os produtores, apesar de sua relevância reprodutiva (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2005). Além disso, Holt *et al.* (2005) afirmaram que a grande variação na capacidade de resistir ao congelamento/descongelamento existente entre varrões também é uma das razões que impedem o uso rotineiro do sêmen congelado na indústria de produção de suínos.

Nos últimos anos, grande importância tem sido dada aos componentes do plasma seminal do varrão, principalmente às glicoproteínas espermadesinas, principais produtos secretados pelo epitélio das vesículas seminais de certos animais domésticos, como por exemplo o varrão, o touro e o garanhão (Assreuy *et al.*, 2002). O plasma seminal contém uma grande variedade de fatores que influenciam a funcionalidade dos espermatozoides (Rodríguez-Martínez *et al.*, 1984), apesar dos seus efeitos biológicos sobre a função

espermática serem complexos e ainda não bem compreendidos. A presença, ausência ou magnitude da concentração de alguns componentes, mais provavelmente de proteínas, oriundas tanto do epidídimo, quanto das glândulas sexuais acessórias, podem ser responsáveis pela variação dos seus efeitos observados – benéficos ou deletérios – sobre os espermatozoides (Maxwell e Johnson, 1999). Existe uma grande variação na composição do plasma seminal entre as espécies ou até mesmo entre machos da mesma espécie e até mesmo entre ejaculados de um mesmo macho (Zhu *et al.*, 2000).

Rodríguez-Martínez *et al.* (2005) demonstraram que os espermatozoides contidos nos primeiros 10mL (porção 1 ou P1) da fração espermática rica do ejaculado (70 a 100 mL) são os que mais contribuem para a formação do reservatório espermático na tuba uterina da fêmea, além de apresentarem maior resistência à manipulação durante os processos de resfriamento e congelamento. Além disso, Saravia *et al.* (2010) observaram uma concentração espermática média, nos primeiros 10 mL de ejaculado, de 1.600 milhões de espermatozoides por mL.

Já Alkmin (2010), encontrou uma concentração espermática média nos primeiros 15 mL do ejaculado, de 1.503 milhões de espermatozoides por mL. No mesmo trabalho, avaliando-se a fertilidade de fêmeas suínas inseminadas com sêmen fracionado diluído e resfriado a 5°C ou 17°C, concluiu-se que a utilização da coleta fracionada pode ser feita de maneira simples e eficiente na rotina das centrais de inseminação. Além disso, propôs-se que a utilização da P1 ou fração rica (super concentrada) possibilitará o surgimento de novas propostas no que diz respeito ao transporte do sêmen suíno, enquanto o restante do ejaculado mostrou-se eficiente para o uso interno nas granjas.

De acordo com Desjardins e Hafs (1962), o uso do sêmen congelado de bovinos depende do seu armazenamento a -79°C ou a temperaturas inferiores (-196°C) até o seu uso para inseminações imediatamente após o descongelamento. A manutenção destas baixas temperaturas para o armazenamento do sêmen, bem como o seu transporte até o local das inseminações, aumentam os custos de qualquer programa utilizando sêmen congelado. Como alternativa, seria desejável, ao menos em algumas circunstâncias, a manutenção de fertilidade satisfatória do sêmen congelado bovino, após o descongelamento, durante armazenamento a 5°C , por períodos tão longos quanto dois ou três dias. Desta forma, Bratton *et al.*, (1955) sugeriram a possibilidade do congelamento do sêmen bovino super concentrado e sua rediluição após o descongelamento, para doses apresentando uma concentração normal e utilizável comercialmente.

Neste sentido, Macmillan *et al.*, (1978) trabalhando com o sêmen congelado de touros afirmaram que o sêmen rediluído após descongelamento, e utilizado para inseminações dentro de 4 a 8 horas após o descongelamento e rediluição, poderia reduzir os custos de armazenamento e transporte de sêmen, bem como aumentar o número de doses inseminantes por touro. Afirmaram, ainda, que tal procedimento poderia ter uma aplicação potencial em programas incluindo sincronização de cio, em países onde a inseminação artificial estivesse ainda em desenvolvimento.

No Brasil, a utilização do sêmen suíno transportado não é rotina nas centrais de inseminação; de modo que cada sistema de produção mantém a sua própria central. Em alguns casos, ocorre o transporte das doses inseminantes para centrais próximas e/ou para outros estados (Bortolozzo e Wentz, 1997). No entanto, o transporte é realizado dentro de caixas de isopor, sem nenhum controle da temperatura e, em alguns casos, em geladeiras de menor tamanho ou caixas

térmicas que mantém a temperatura a 17°C . Essas caixas ou geladeiras portáteis são importadas e encontradas no mercado a um custo muito elevado; e o rigoroso controle sanitário, principalmente em granjas núcleo, inviabiliza a reentrada das caixas transportadoras, o que onera ainda mais o transporte, e conseqüentemente o custo de produção.

Existem poucos estudos envolvendo a preservação do sêmen suíno à 5°C visando avaliar sua eficiência “*in vivo*”, através do seu uso em programas de inseminação artificial e posterior avaliação dos parâmetros de fertilidade, tais como das taxas de prenhez, de parto, de retorno ao cio e do tamanho da leitegada (Braga, 2007), e que visam à viabilização do transporte do sêmen de varrões para uso rotineiro em granjas.

Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos de duas diferentes concentrações espermáticas, 150 ou 240 milhões de espermatozoides/ml, oriundos da P1, diluídos em glicina-gema de ovo e armazenados a 5°C por 12 horas, previamente a uma rediluição para doses padrão de 3 bilhões de espermatozoides em 100 mL, sobre a fertilidade e prolificidade de fêmeas suínas inseminadas, de modo a propor um protocolo de resfriamento e transporte do sêmen suíno que possa ser rotineiramente utilizado nas granjas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O ejaculado do varrão

A ejaculação é um processo fisiologicamente coordenado, que envolve eventos neurológicos e musculares, com duas fases distintas, sendo a primeira (a) representada pela emissão, ou seja, formação e deposição do sêmen (espermatozoides e fluido seminal) na

uretra; (b) pela ejeção de sêmen através da uretra peniana (também chamada expulsão, ou ejaculação propriamente dita). Em varrões, a emissão e ejaculação se repetem como ondas por 5-10 minutos, durante os quais o ejaculado completo (aproximadamente 250-300 ml no varrão maduro) é vertido sequencialmente no cérvix ou é manualmente coletado em um recipiente (Senger, 2003).

As primeiras ejaculações em varrões acontecem entre cinco e seis meses de idade, ao início da puberdade; sendo os machos considerados pós-púberes de oito a 12 meses e como adultos a partir de um ano de idade (Córdova-Izquierdo, 2005).

O ejaculado é uma suspensão espermática, com aproximadamente $50-90 \times 10^9$ de espermatozoides em machos de nove meses, chegando até $70-110 \times 10^9$ em animais com 12 meses de idade, quando se tornam sexualmente maduros (Flowers, 2008); suspensos em um plasma seminal (PS) composto de uma mistura de componentes da cauda dos ductos epididimários e secreção das glândulas sexuais acessórias (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2009).

Durante a monta natural, que pode ocorrer tão cedo quanto a fêmea exiba comportamento espontâneo de cio, o varrão deposita todo o ejaculado no canal cervical, com rápida passagem para o lúmen uterino, que se encontra significativamente distendido. O número médio de espermatozoides ejaculados é superior a 30×10^9 , sendo que 70% a 99% destes espermatozoides são rapidamente eliminados do lúmen uterino. Destes, 30% a 35% são eliminados por fluxo retrógrado após a IA (quando a secreção coagulante das glândulas bulbouretrais é removida). A maioria dos espermatozoides é eliminada dentro do útero, com exceção de uma pequena subpopulação de espermatozoides que é rapidamente transportada pelas contrações miométriais em direção a junção

uterotubárica, durante a denominada fase rápida do processo de transporte espermático no sistema genital feminino (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2005).

No entanto, quando o sêmen é processado para a inseminação artificial, o número de espermatozoides e a proporção de plasma seminal em cada dose de sêmen são severamente reduzidos. Desta forma, a questão óbvia é: a remoção do plasma seminal afeta negativamente a fertilidade? (Jonhson *et al.*, 2000). O plasma seminal exerce efeitos fisiológicos na fêmea, incluindo o transporte de espermatozoides até a tuba uterina, o avanço do momento da ovulação, a modulação da resposta imune uterina, além de agir, possivelmente, no remodelamento do útero de forma a prepará-lo para a recepção dos conceitos. Além dos efeitos exercidos na fêmea, o plasma seminal também afeta a fisiologia espermática (Kirkwood *et al.*, 2008). Em varrões e em touros, a incubação dos espermatozoides em plasma seminal autólogo ou homólogo (de outro macho da mesma espécie) à temperatura ambiente aumentou a resistência espermática ao choque térmico; processo que ocorre quando espermatozoides recém ejaculados são resfriados (Pursel *et al.*, 1973; Eriksson *et al.*, 2001).

A ejaculação nos suínos é um processo peculiar e longo, sendo o sêmen liberado em vários jatos, arbitrariamente agrupados em três frações, de acordo com sua ordem de ejaculação e concentração espermática (Lavon e Bournnell, 1975; Garner e Hafez, 1996; Peña *et al.*, 2006; Saravia *et al.*, 2009). Estas diferentes frações são assim caracterizadas: I - Fração pré – espermática (FPE), com fluido seminal límpido, algum volume de gel e alto grau de contaminação por debris celulares, urina e esmegma do prepúcio (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2009). A fração pré – espermática é formada por secreções oriundas da próstata, glândulas vesiculares e glândulas bulbouretrais, com volume de cerca de 10-15 mL. Esta fração

não contém espermatozoides, apresentando, normalmente, aparência clara a transparente (Peña *et al.*, 2006); II – Fração rica em espermatozoides (FRE), facilmente reconhecida por sua coloração branca-cremosa (Rodriguez-Martinez *et al.*, 2009). O volume varia de 70 a 100 mL, e apresenta alta concentração espermática, variando de 0,5 a 1×10^9 espermatozoides/mL (>80 – 90% dos espermatozoides ejaculados), contendo secreções oriundas da próstata e glândulas vesiculares; III – Fração pós – espermática (FPOE), cuja coloração e aspecto são acinzentada e aquosa, respectivamente. O volume varia de 150 a 200 mL e poucos espermatozoides. Apresenta concentração menor que 1×10^6 espermatozoides/mL e uma secreção gelatinosa oriunda das glândulas bulbouretrais, sendo também caracterizada pelo grande volume de plasma seminal (Rodriguez-Martinez *et al.*, 2009). Durante a coleta manual, o coletador pode facilmente identificar as diferentes frações, principalmente pelas diferenças na coloração e aparência (Wallgren *et al.*, 2010).

De acordo com estudos anteriores envolvendo a influência do plasma seminal sobre a fisiologia espermática e nas diferentes frações do ejaculado do varrão, Rodriguez-Martinez *et al.* (2005), determinaram que os espermatozoides contidos nos primeiros 10 – 15 mL (P1) da FRE compõem a população celular ejaculada que contribuirá significativamente para a formação do reservatório espermático na tuba uterina da fêmea, simplesmente porque é a subpopulação espermática que chega primeiro (razões puramente mecânicas).

Outros trabalhos determinaram que os espermatozoides contidos na P1 sobrevivem melhor à manipulação durante o resfriamento e a criopreservação, quando comparados aos demais espermatozoides presentes no restante do ejaculado (Sélles *et*

al., 2001; Peña *et al.*, 2003, 2004a; Saravia *et al.*, 2007).

Dessa forma, tem sido hipotetizado que existem diferenças qualitativas e/ou quantitativas na composição do plasma seminal entre a P1 e P2 (restante) do ejaculado (Saravia *et al.*, 2009).

2.2. Características das frações do ejaculado do varrão

Muito progresso tem sido feito quanto à identificação de indicadores confiáveis da qualidade do sêmen, de forma a permitir a exclusão de ejaculados de baixa qualidade para uso na IA. A avaliação física e morfológica do sêmen não é sempre indicativa de fertilidade e desempenho reprodutivo de varrões, de forma que a identificação de marcadores genéticos e protéicos acurados e preditivos ainda são necessários (Foxcroft *et al.*, 2008).

O PS é definido como o meio líquido no qual os espermatozoides se encontram imersos após a ejaculação, sendo formado por uma mistura de secreções oriundas dos túbulos seminíferos, epidídimos e das glândulas sexuais acessórias (Mann e Lutwak-Mann, 1981). As funções do PS se referem principalmente à nutrição, proteção, regulação da motilidade e capacitação espermática, reconhecimento e união entre gametas e de uma maneira mais indireta à sua ação sobre o sistema genital da fêmea, aumentando as contrações uterinas, modulando a resposta imune uterina e levando ao relaxamento do istmo da tuba uterina (Johnson *et al.*, 2000).

O PS afeta vários atributos dos espermatozoides do varrão, ou seja, aumenta a sua motilidade, assim como a sua resistência ao choque pelo frio e ao estresse oxidativo. Além disso, aumenta também sua resistência à desestabilização de sua

membrana plasmática, bem como a danos ao DNA (Saravia *et al.*, 2009).

O ejaculado do varrão difere do ejaculado do carneiro e do touro de várias maneiras, sendo o volume maior e a concentração espermática menor. Além disso, a ejaculação acontece em várias ondas, sendo o processo mais demorado (Mckenzie *et al.*, 1938). Além disso, como citado anteriormente, é possível distinguir três principais frações, designadas fração pré-espermática, fração espermática rica e fração pós-espermática, de acordo com a distribuição espermática (Lavon e Bournsnell, 1975).

A maioria dos estudos referentes ao plasma seminal do varrão tem sido feitos no ejaculado completo, uma vez que esta é a forma como o ejaculado tem sido coletado. No entanto, existem excelentes estudos em amostras fracionadas do PS do varrão, os quais têm demonstrado que, devido a sua formação sequencial, o PS contém muitos componentes, todos interagindo com os espermatozoides e com o sistema genital feminino (Rodriguez-Martinez *et al.*, 2009).

A fração pré espermática contém basicamente eletrólitos, principalmente Na⁺ e Cl⁻; a fração espermática rica contém principalmente proteínas, além de hormônios esteróides (Claus *et al.*, 1987; Saravia *et al.*, 2009), glicerilfosforilcolina, frutose, glicose, inositol, citrato, bicarbonato e zinco, enquanto a fração pós espermática é formada por volumes crescentes de proteínas, bicarbonato, zinco, Na, Cl e ácido siálico (Rodriguez-Martinez *et al.*, 2009; Saravia *et al.*, 2009).

As proteínas são os principais componentes do ejaculado do varrão, com 39,4-13,45mg/mL de acordo com Rodriguez-Martinez *et al.* (2005). Destas, 80-90% são derivadas das glândulas vesiculares, com 75-90% pertencendo à família das espermadesinas-lecitas (Rodriguez-Martinez *et al.*, 2009; Saravia *et al.*, 2009).

As espermadesinas, uma família de glicoproteínas de baixo peso molecular (12 – 16 kDa), são os principais produtos secretados pelo epitélio da vesícula seminal de certos animais domésticos, dentre eles o touro, o garanhão e o varrão (Calvete *et al.*, 1995).

Membros desta família de glicoproteínas desempenham atividade heparina-ligante e carboidrato-ligante e recobrem a superfície do terço apical do acrossoma espermático na ejaculação. A maioria das espermadesinas que cobrem a superfície espermática é perdida durante a capacitação. Esta população de espermadesinas pode atuar como fator decapacitante ou estabilizante do acrossoma, impedindo a ocorrência da reação acrossômica prematura. Em contrapartida, as espermadesinas ligantes atuam na ligação entre glicoproteínas espermáticas e lecitinas da zona pelúcida, durante o reconhecimento gamético na fertilização. No entanto, as duas principais espermadesinas do varrão, Porcine Seminal Plasma Proteins (PSP-I e PSP-II), representam acima de 50% do total de proteínas plasmáticas e formam um heterodímero não covalente, que se liga de forma fraca à superfície espermática, sendo facilmente removido durante a capacitação *in vitro* (Calvete *et al.*, 1995). Para Assreuy *et al.* (2002) o heterodímero não é capaz de se ligar à membrana plasmática dos espermatozoides, caracterizando outra população de espermadesinas.

As heparinas são glicosaminas lineares fortemente ácidas compostas de unidades repetidas de D-glicosaminas e resíduos de ácido hexurônico, substituídos com O-sulfatos e N-sulfatos, sendo produzidas pela maioria das células animais. Heparinas e Heparan-sulfato (GAG's) se ligam a uma grande variedade de células associadas à superfícies, sendo importantes tanto para a fisiologia quanto para o desenvolvimento. Além disso, têm sido encontradas também associadas à proteínas da matriz

extracelular e como secreção. Estas interações parecem ser importantes nos diversos processos biológicos. Heparinas e GAG's exercem seus efeitos via modulação da atividade de proteínas as quais se ligam, sendo que o número de proteínas com propriedades GAG-ligantes implicadas nas suas ações biológicas vem aumentando e incluem enzimas, inibidores enzimáticos, proteínas da matriz celular, glicoproteínas de superfície viral, fatores de coagulação sanguínea, citocinas, fatores de crescimento, lecitinas, dentre outras. GAG's tipo heparinas, secretadas pelo epitélio do sistema genital feminino, particularmente em altas concentrações durante a fase folicular do ciclo estral, têm sido relacionadas à indução da capacitação espermática em várias espécies, sendo seus efeitos mediados, aparentemente, pelas proteínas ligantes de heparina do PS (Calvete *et al.*, 1997).

As espermedesinas são formadas a partir de um único domínio "CUB", que ocorrem em variadas combinações em mosaicos de proteínas estruturalmente e funcionalmente não relacionadas, servindo como esqueleto estrutural onde diferentes funcionalidades podem ser imprimidas (Romero *et al.*, 1997).

Dessa forma, esta família compreende três membros: as proteínas Alanina-Glutamina-Asparagina AQN (-1 a -3), as proteínas Alanina-Triptofano-Asparagina (AWN's) e as Proteínas do Plasma Seminal do Suíno ou PSP's (Porcine Seminal Plasma Proteins) I e II, PSP-I e PSP-II (Topfer-Petersen *et al.*, 1998).

As atividades biológicas das espermedesinas dependem da sua sequência, do quanto são glicosiladas e do seu estado de agregação, assim como de sua habilidade de se ligar à heparina ou não. As proteínas AQN-1, AQN-3 e AWN se ligam à heparina e são classificadas como HBP's (Heparin-Binding Proteins ou Proteínas ligadoras de heparina), sendo que as PSP's

não se ligam à heparina, embora se liguem à membrana plasmática dos espermatozoides em vários graus, desde os testículos até a ejaculação (Rodriguez-Martinez *et al.*, 2009).

As várias proteínas do plasma seminal se originam dos testículos, do epidídimo e das glândulas sexuais acessórias. Dessa forma, a concentração de proteínas aumenta aproximadamente quatro vezes, paralelamente à secreção das glândulas vesiculares. A menor concentração é encontrada na P1, aumentando as HBP's e, particularmente, as PSP's na fração pós-espermática. Assim, verifica-se que a maior parte dos espermatozoides não são suspensos, imediatamente, em altas concentrações de proteínas do PS *in vivo*, particularmente aqueles contidos na P1 (Rodriguez-Martinez *et al.*, 2005).

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 três anos de idade. A alta correlação existente entre a concentração de proteínas do PS e a habilidade fertilizante dos espermatozoides, tem sido utilizada como critério para prever a fertilidade de machos (Killian *et al.*, 1993; Flowers, 1997).

Diferenças qualitativas e quantitativas na composição protéica das frações P1 e P2 podem explicar porque os espermatozoides da P1 se comportam melhor durante o resfriamento e sobrevivem em maiores proporções, quando comparados aos espermatozoides da P2 (Saravia *et al.*, 2009).

De acordo com Saravia *et al.* (2009), o PS da P2 consiste quase que exclusivamente de espermedesinas, particularmente as formas glicosiladas PSP-I e PSP-II, cada uma contendo um único resíduo N-asparagina glicosilado. No entanto, a fração P1

também contém estas espermadésinas, embora em menores concentrações e com menores pesos moleculares. A maior parte das glicofomas de PSP-I tem massa molecular de 13,565; 13,949 e 14, 092 Da. Em contrapartida, a massa molecular das moléculas PSP-II é maior (14,069; 14,213 e 14,755). Basicamente, apesar de ambas P1 e P2 conterem espermadésinas, a P1 contém proteínas de origem epididimária, que são exclusivas da P1 ou encontradas em menores concentrações na P2. Assim, verificou-se que os espermatozoides da P1 continuam expostos a substancial quantidade de fluido da cauda do epidídimo.

Está bem estabelecido que os espermatozoides contidos na cauda do epidídimo do varrão resistem melhor à rotina de resfriamento e congelamento do que os espermatozoides ejaculados. Desta forma, o fato da P1 ainda conter relativamente altas concentrações de fluido epididimário poderia explicar o melhor desempenho dos espermatozoides contidos nesta fração (Saravia *et al.*, 2009).

No trabalho desenvolvido por Garcia *et al.* (2009), demonstrou-se que o heterodímero PSPI/PSPII está presente em todas as frações do ejaculado, apesar de sua concentração aumentar na P2, paralelamente às HBP's. Ao contrário, a FRE ou a P1 é caracterizada pelas menores concentrações de proteínas totais (15,37mg/mL) e também do heterodímero (1,8mg/mL), assim como pela menor concentração de HBP's.

Os efeitos deletérios dos espermatozoides altamente diluídos da fração pós-espermática, na qual o heterodímero PSPI/PSPII alcança concentrações de >10mg/mL, citados por Garcia *et al.* (2009) estão de acordo com estudos anteriores quando demonstrou-se que o heterodímero possui ótima função de proteção espermática na concentração de 1,5mg/mL. Sua presença passa a apresentar efeitos

negativos quando em concentrações >7,5mg/mL (Centurión *et al.*, 2003).

Em um estudo realizado em ratos, demonstrou-se que as espermadésinas PSPI/PSPII e suas subunidades desempenham atividade quimiotática aos polimorfonucleares (PMN's) *in vitro*. Além disso, o efeito tempo dependente exercido pelo heterodímero PSPI/PSPII, quanto ao recrutamento de células mononucleares e neutrófilos até a cavidade peritoneal de ratos, demonstrou padrão de reação inflamatória. O efeito pró-inflamatório da subunidade PSPI parece envolver uma interação direta com neutrófilos, enquanto a atividade PSPI/PSPII e PSPII de migração neutrofílica parece ser potencializada por macrófagos residentes, os quais podem liberar um fator quimiotático, possivelmente citocinas (Assrey *et al.*, 2003).

Um estudo envolvendo oito porcas, distribuídas aleatoriamente em grupos controle e tratado, demonstrou o efeito do heterodímero na resposta imune uterina. O grupo controle foi inseminado com soro fisiológico estéril (dose de 100mL, 0,9% de NaCl), enquanto o grupo tratado foi inseminado com um isolado do heterodímero PSPI/PSPII em soro fisiológico estéril (3mg/mL, em dose de 100mL). Todas as porcas foram inseminadas no primeiro dia de cio e abatidas aproximadamente 3h após a IA. Os cornos uterinos foram divididos em direito e esquerdo por grampos cirúrgicos, deixando um segmento de 5cm adjacente à tuba uterina e outro adjacente ao corpo uterino para exame histológico, os quais foram fixados por imersão em glutaraldeído tampão cacodilato 2,5%. Os segmentos medianos restantes foram lavados com 50mL de soro, sendo o fluido coletado para exame. Aproximadamente 96% das células encontradas após lavagem foram leucócitos, basicamente PMN. A simples infusão de soro (grupo controle) foi capaz de provocar a migração de PMN até o lúmen uterino

($238 \pm 104,92$ milhões de PMN). Entretanto, um número médio seis vezes maior de PMN ($1524 \pm 298,70$ milhões) foi recuperado do lúmen uterino de porcas inseminadas com o heterodímero. Tal observação confirma que mesmo diante de concentrações cinco vezes menores que as encontradas no ejaculado do varrão, o heterodímero induziu a migração de PMN *in vivo* em porcas (Rodríguez-Martinez *et al.*, 2001).

Durante a monta natural nos suínos, os primeiros espermatozoides alcançam a junção útero-tubárica e a primeira porção do istmo da tuba uterina em minutos até 1-2 horas, com a formação de um reservatório espermático pré-ovulatório (com 10^5 a 10^8 espermatozoides). A sua formação com número suficiente de espermatozoides para fertilizar todos os oócitos ovulados ocorre dentro de aproximadamente 3h após a cobrição; entretanto, o período considerado crítico para a sua formação está entre 5 – 60 minutos (Hunter, 1981; Viring e Einarsson, 1981).

O restante dos espermatozoides ($10 - 50 \times 10^9$) será perdido por fluxo retrógrado (aproximadamente 35%) ou eliminado por fagocitose pelos PMN uterinos. Estes PMN migram da lâmina própria subjacente ao epitélio endometrial, onde se acumulam após extravasamento, provavelmente como resultado das altas concentrações de estrógeno circulantes na porca durante o proestro. Esta migração não é imediata após a cobrição, sendo a presença massiva de PMN primeiramente detectada trinta minutos após a deposição do sêmen, aumentando de maneira contínua nas 2-3 horas seguintes (Rozeboom *et al.*, 1999; Woelder e Mattjis, 2001).

Os espermatozoides contidos na P1 do ejaculado serão os primeiros a colonizar o reservatório espermático. Há que se enfatizar, além disso, que a ausência de mediadores da inflamação PSPI/PSPII nesta fração espermática pode prover uma janela

de oportunidade para que os espermatozoides alcancem o reservatório espermático antes que os PMN cheguem ao lúmen uterino (Rodríguez-Martinez *et al.*, 2005).

Com relação às diferenças eletrolíticas do plasma seminal, é importante lembrar que os espermatozoides saem de um ambiente pobre em bicarbonato como o epidídimo (3-4mM) para um ambiente rico em bicarbonato como o plasma seminal do varrão (20-23mM/L). O íon bicarbonato é altamente relevante para a motilidade espermática, assim como para a indução de mudanças na estabilidade da membrana plasmática dos espermatozoides. Assim, é importante para a capacitação e reação acrossômica, eventos fundamentais para a fertilização do oócito (Rodríguez-Martinez *et al.*, 1990; Gadella e van Gestel, 2004). As suas concentrações variam entre as frações, de 14mmol/L na fração pré-espermática, para 17mmol/L na FRE, alcançando na fração pós-espermática, acima de 30mmol/L.

A concentração de bicarbonato é menor na P1 (aproximadamente 13mmol/L), ou seja, a primeira população espermática do ejaculado não é diluída no PS com alta concentração de bicarbonato, sendo este fato implicado na menor motilidade encontrada para esta fração (Saravia *et al.*, 2009).

Ao compará-lo com outros fluidos corporais, o PS de certos mamíferos como o do homem e o do cão contém alta concentração de zinco (Zn^{2+}). A concentração de zinco na secreção vesicular do varrão é aproximadamente seis vezes maior ($137\mu\text{g/mL}$) que a encontrada no PS ($22,5\mu\text{g/mL}$). Assim, o zinco presente no PS é quase que totalmente oriundo das vesículas seminais. Existem diferenças marcantes quanto à concentração deste cátion no PS, nas diferentes espécies sobre as quais existem dados publicados. Alguns, como o gato, o touro e o carneiro têm

valores relativamente baixos (1,9; <2 e 2,8 µg/mL, respectivamente); enquanto o homem e o cão têm valores maiores (134 e 71,3-86,5 µg/mL, respectivamente) (Bournnell *et al.*, 1972; Massaniy *et al.*, 2003).

É interessante notar que, no varrão, o zinco provém da vesícula seminal, enquanto nas demais espécies origina-se da próstata. A sua menor concentração no PS em relação à secreção vesicular pode ser devido, especialmente, à absorção deste cátion pelos espermatozoides (Bournnell *et al.*, 1972).

O zinco é secretado no PS paralelamente à emissão de frutose, sendo uma de suas funções a estabilização da cromatina espermática (Kvist e Bjorndahl, 1985; Bjorndahl e Kvist, 1990; Bjorndahl e Kvist, 2010).

Durante a sua passagem ao longo do sistema genital masculino e, especialmente, no epidídimo, os espermatozoides dos mamíferos passam por mudanças estruturais e bioquímicas que são consideradas como pré-requisitos para a aquisição de ótima capacidade fertilizante (Bedford e Calvin, 1974). Dentre essas mudanças, a formação progressiva de pontes dissulfeto nas protaminas nucleares tem sido enfatizada (Bedford, 1975).

As protaminas têm importância na morfogênese e estabilização da cabeça dos espermatozoides. Durante a espermiogênese no varrão, protaminas são incorporadas ao núcleo das espermátides alongadas de maneira sequencial e específica (Courtens *et al.*, 1988). Elas são solidamente associadas com o DNA, formando a cromatina altamente condensada dos espermatozoides. Durante o trânsito pós-testicular, a estrutura da cromatina espermática dos espermatozoides é modificada, tornando-se progressivamente mais rígida, principalmente pela formação das forças estabilizadoras nas quais os grupos tiol das cisteínas tem participação.

Pontes envolvendo tiol e zinco também participam desta estabilização, uma vez que o zinco é capaz de “mascarar” tióis (Rodriguez-Martinez *et al.*, 1990).

In vivo, a depleção do zinco leva à redução da estabilidade, sendo seguido por uma “superestabilização” dependente da formação de pontes dissulfeto sem zinco, o que impede a descondensação normal da cromatina durante a fertilização (Rodriguez-Martinez *et al.*, 1990).

Os espermatozoides do varrão, ejaculados na fração pós-espermática, onde a concentração de zinco é significativamente maior, se tornam mais superestabilizados do que aqueles contidos na P1, uma vez que há clara redução da capacidade de se descondensarem *in vitro* no decorrer da ejaculação. No entanto, a concentração total de Zn²⁺ no plasma seminal não é um bom indicador do zinco livre que se equilibra com o conteúdo de zinco espermático. Um aumento concomitante das concentrações de citrato, que tem três sítios de ligação para o zinco em pH levemente alcalino, ou a presença de proteínas ligadoras de zinco podem resultar em um ambiente quelante de zinco (Kvist *et al.*, 1990).

A interação das espermedesinas com outras moléculas e/ou outros solutos do PS pode determinar o comportamento protéico das mesmas. De fato, foi observado recentemente que na presença de concentrações fisiológicas de Zinco (Zn²⁺) no PS do varrão, a termoestabilidade do heterodímero PSPI/PSPII diminuiu significativamente, sendo promovida a sua dissociação. Apesar da integridade da PSPI/PSPII ser garantida pelas altas concentrações de PSPI e PSPII, sítios de ligação internos das subunidades podem ser expostos quando da diluição da proteína no sistema genital feminino (Campanero-Rhodes, 2006; Rodriguez-Martinez *et al.*, 2009).

Diferenças nas características bioquímicas da membrana espermática e,

principalmente, na relação colesterol:fosfolípidos insaturados (Darin-Bennet e White, 1977) são considerados os principais fatores explicando diferenças na sensibilidade à crioinjúria, existentes entre espécies (Peña *et al.*, 2005).

A coexistência de diferentes subpopulações espermáticas é vastamente aceita pela comunidade científica atual. A origem destas subpopulações ainda não está clara, mas suspeita-se que correspondam à diferenças na formação individual dos espermatozoides, durante a espermatogênese, assim, como a sua diferença maturacional e de idade quando deixam a cauda do epidídimo na ejaculação (Abaigar *et al.*, 1999; Peña *et al.*, 2005).

Como citado anteriormente, a qualidade espermática após a criopreservação ou ao resfriamento do sêmen do varrão, difere de acordo com a fração do PS em que os espermatozoides estão contidos (Peña *et al.*, 2003, 2004b; Saravia *et al.*, 2009; Alkmin, 2010). Além dos fatores discutidos anteriormente, outros podem estar relacionados a esta diferença, como súbitas diferenças morfométricas na morfologia da cabeça espermática. No trabalho de Peña e colaboradores (2005), demonstrou-se a existência de súbitas diferenças morfométricas entre os espermatozoides presentes no ejaculado de diferentes varrões.

É notável que quando comparações são feitas entre espécies, sobre a sua capacidade de resistir ao choque pelo frio, existem claras diferenças entre elas (Watson e Plummer, 1985). Assim, os espermatozoides das espécies mais resistentes, como o touro, são menores e mais arredondados. É então, plausível pensar que os espermatozoides podem variar em suas propriedades físicas dependendo da sua forma. Apesar da sua relação com vários outros fatores, a importância do formato é que existem provavelmente características herdadas

(Thruston *et al.*, 2001), o que aponta para a possibilidade de se identificarem varrões com “boa” ou “má” congelabilidade, através do estudo morfométrico dos ejaculados (Quintero-Moreno *et al.*, 2003; Peña *et al.*, 2005).

2.3. Características físicas e morfológicas do sêmen

Os espermatozoides de um ejaculado devem apresentar as seguintes características: motilidade progressiva, morfologia normal, metabolismo energético ativo, capacidade para desenvolver motilidade hiperativada, integridade estrutural e funcional da membrana, integridade das enzimas associadas com a fecundação, capacidade de penetração e transferência ótima do material genético (Graham, 1996).

A eficiência reprodutiva geral de uma granja de suínos é altamente correlacionada com a capacidade reprodutiva ou fertilidade dos machos. Varrões de baixa qualidade, devido à estrutura poligâmica da produção de suínos, afetarão a eficiência reprodutiva de várias fêmeas, principalmente quando do uso da IA (Foxcroft *et al.*, 2008).

Cada vez que uma inseminação ou cobertura acontece, o varrão e a porca são geralmente vistos como se contribuíssem de forma igualitária para os resultados. A fertilização requer a colocação de um número adequado de espermatozoides férteis no sistema genital feminino antes que a ovulação aconteça, o que é intimamente relacionado ao processo reprodutivo e ao comportamento dos varrões. No entanto, quando todo o rebanho reprodutivo é considerado, um único macho tem um impacto significativamente maior na eficiência e produtividade que uma fêmea individualmente. Isto se deve ao fato de que a fêmea normalmente produz duas leitegadas por ano, enquanto um macho

pode produzir de 50 a 3000, dependendo do sistema de reprodução da granja. Desta forma, estratégias de manejo envolvendo os varrões tendem a influenciar a produtividade do rebanho de modo exponencial, sendo o principal componente para a eficiência reprodutiva em suínos (Flowers, 1997).

A porcentagem de espermatozoides viáveis é importante para o sucesso da fertilização, existindo no ejaculado do suíno aproximadamente 65% a 85% de células espermáticas capazes de fertilizar (Bonet *et al.*, 1995; Pinart *et al.*, 1999). Desta forma, o exame do sêmen é uma importante ferramenta para se estimar a capacidade fertilizante de um ejaculado.

A avaliação convencional do sêmen inclui mensurações do volume, da concentração espermática e da porcentagem de espermatozoides com motilidade progressiva e morfologicamente normais. Embora alguns destes parâmetros estejam correlacionados com a fertilidade no varrão, vários autores sugerem que esta informação, apesar de importante, não prediz acuradamente quando um macho é verdadeiramente fértil (Foxcroft *et al.*, 2008). No entanto, avaliações das características de motilidade e de alterações morfológicas são os testes mais utilizados rotineiramente (Martín-Rillo *et al.*, 1996).

Rodriguez-Martinez (2003) sugere que para predizer acuradamente a fertilidade do sêmen é necessário testar todos os atributos espermáticos relevantes à fertilização e desenvolvimento embrionário, dentro de grandes populações espermáticas. Torna-se necessário também, desenvolver técnicas *in vitro* que irão predizer a fertilidade de pequenas doses espermáticas usadas para a IA. O autor sugere, ainda, que estas técnicas devem fornecer, e predizer acuradamente, a fertilidade *in vivo*.

2.3.1. Avaliação do varrão e coleta do sêmen

A avaliação reprodutiva do varrão deve conter, primeiramente, o histórico completo do animal. A idade exata de varrões jovens é especialmente importante uma vez que seu espermograma mudará com a chegada da puberdade. Também devem constar da ficha de avaliação, a identificação do animal (nome, número e/ou tatuagem), raça, experiência sexual prévia, tipo de alojamento, condições de criação, manejo nutricional, condição corporal, libido, habilidade de monta, sendo os dados reprodutivos associados, tais como as taxas de parto, o tamanho de leitegada e a frequência de coleta/cobertura igualmente relevantes (Shibley, 1999).

Os testículos devem ser palpados e medidos, sendo a ultrassonografia uma maneira de se aferir acuradamente as medidas testiculares (Tabela 1). Testículos são simétricos, firmes e levemente elásticos. Alguns estudos têm observado que o testículo esquerdo pode ser um pouco maior que o direito, apesar de não haver diferença estatística significativa entre os mesmos (Hurtgen, 1984; Shibley, 1999).

Além disso, sabe-se que a produção espermática responde à seleção para tamanho do testículo, e que varrões selecionados para testículos maiores produziram 6×10^9 espermatozoides a mais por ejaculado do que o grupo controle submetido a cruzamentos ao acaso sem seleção; isto representa um aumento de aproximadamente 10%. Além disso, a produção espermática diária aumenta mais rapidamente e se estabiliza mais precocemente nas linhas selecionadas para maior tamanho testicular (Flowers, 2007).

Também os epidídimos devem ser cuidadosamente avaliados, devendo ser simétricos à palpação. A cabeça do epidídimo normalmente é firme, tendendo a

cauda a ser tensa e larga, possuindo até 4-5 cm no animal adulto (Hurtgen, 1984).

A fertilidade do varrão também pode ser afetada por temperaturas extremas, sendo

importante saber se o macho esteve febril ou submetido a altas temperaturas ambientes (Holst, 1949; Gibson, 1983).

Tabela 1: Tamanho dos testículos em relação a idade do varrão

Idade	Tamanho Testicular Mínimo	Tamanho Testicular Esperado
6-7 meses	4,5 x 7,0 cm	5,5 x 8,5 cm
8-9 meses	5,0 x 8,0 cm	6,0 x 9,5 cm
10-12 meses	5,5 x 8,5 cm	6,5 x 10,0 cm
12-15 meses	6,0 x 9,5 cm	7,0 x 11,0 cm
>15 meses	6,5 x 10,0 cm	> 7,0 x 11 cm

Fonte: Adaptado de Shipley (1999).

A pele escrotal deve ser livre de cicatrizes, abscessos, espessamentos e irritações. Os testículos devem se mover livremente dentro do escroto, não devendo haver excesso de fluido. Algum fluido pode ser detectado, especialmente em varrões mais velhos (Hurtgen, 1984).

O prepúcio e o divertículo prepucial devem ser examinados para sinais de irritação ou infecção, devendo a presença de diverticulite prepucial ser investigada. Alguns varrões acumulam grandes volumes de urina no divertículo prepucial, podendo haver também acúmulo de sêmen quando existe o hábito de masturbação. Evidência de sangue, urina em excesso, sêmen ou gel podem indicar a necessidade de uma investigação mais profunda, tratamento e correção cirúrgica (D'Alleire *et al.*, 1992).

O pênis é examinado durante a coleta de sêmen, quando deve-se avaliar a presença de *frenulum* persistente, lacerações, úlceras, escaras e evidências de irritação/infecção/danos causados por pêlos prepuciais ou por materiais usados como cama (Shipley, 1999).

Existem três métodos para coleta de sêmen no varrão: 1) vagina artificial; 2) método da mão enluvada; 3) eletro ejaculação.

A vagina artificial foi o primeiro método desenvolvido para a coleta de sêmen do varrão, mas com o advento da técnica da mão enluvada, que se mostrou mais fácil, deixou de ser usada (Holst, 1949).

A técnica da mão enluvada é descrita por vários autores (Hancock e Howell, 1959; Gibson, 1983; Hurtgen, 1984; Morrow, 1986).

Varrões geralmente demonstram interesse em montar objetos parados, desta forma, não se faz necessária a presença de uma fêmea no cio para a coleta de sêmen a ser processado para IA (Althouse *et al.*, 2001).

A coleta de sêmen deve ser feita com técnicas sanitárias que minimizem a contaminação, que incluem: 1) cortar periodicamente os pêlos prepuciais; 2) se necessário, limpar a abertura prepucial e toda área ao redor com pano de limpeza descartável (isto é, limpeza profunda); 3) retirar todo o fluido prepucial manualmente antes de começar a coleta; 4) usar uma luva por varrão e descartar as luvas usadas no

lixo; 5) segurar o pênis perpendicular ao varrão para evitar que o líquido prepucial restante chegue ao copo coletor por gravidade; 6) descartar os primeiros jatos, ou seja, a fração pré-espermática que contém lavado uretral e urina; 7) filtrar o ejaculado antes do processamento em laboratório (Althouse *et al.*, 2010).

O sêmen deve ser coletado em copo coletor de plástico descartável com capacidade variando entre 300 – 500 mL, coberto com gaze ou filtro para separar a fração gel do ejaculado e pré-aquecido a 37°-38°C. Além disso, este copo coletor deve ser devidamente protegido por um copo isotérmico adequado. A ejaculação dura aproximadamente 3-5 minutos (Shipley, 1999) ou 5-7 minutos (Althouse *et al.*, 2010).

A eletroejaculação é também uma opção, principalmente para animais de difícil coleta e/ou perigosos. A sua utilização é comparável à coleta pelo método da mão enluvada (Basurto-Kuba e Evans, 1981). No entanto, requer o uso de anestesia quando de sua utilização, o que a torna mais cara e também mais arriscada, principalmente para animais positivos para a Síndrome do Estresse Suíno (Porcine Stress Syndrome – PSS) (Shipley, 1999).

2.3.2. Volume, coloração e aspecto do sêmen

As avaliações microscópicas do sêmen constituem o padrão para a aceitação ou rejeição de um ejaculado; apesar disso, é importante não se esquecer das características visuais e olfatórias óbvias do sêmen (Rozeboom *et al.*, 2000).

O volume normal do ejaculado varia de 100 - 300 mL em varrões jovens, aumentando para 100 – 500 mL em varrões adultos maduros. O volume irá também variar de acordo com a idade, resposta a coleta e

frequência de coleta; sendo importante para o cálculo do número total de espermatozoides ejaculados (Shipley, 1999).

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

O ejaculado total, dependendo da concentração, deve possuir coloração branca e aspecto leitoso. A cor pode se tornar amarelada algumas vezes, embora presente, normalmente, aparência similar ao leite desnatado. Ocasionalmente, pequena quantidade de sangue, normalmente de origem uretral, pode estar presente no ejaculado, conferindo ao mesmo uma coloração rosada. Isto não reduz a fertilidade ou viabilidade do sêmen, embora em casos onde a coloração rosa é mais escura e associada a odor pungente o sêmen deva ser descartado (Rozeboom *et al.*, 2000; Córdova-Izquierdo *et al.*, 2007).

O sêmen coletado não deve possuir odor digno de nota, e se o têm, procedimentos sanitários inadequados provavelmente ocorreram. Odores fortes, na maioria das vezes, refletem a contaminação com fluido prepucial, que possui alta carga bacteriana. A contaminação bacteriana é associada a menor longevidade espermática, aglutinação e infecções uterinas persistentes, sendo então necessárias medidas preventivas para redução da contaminação à coleta (Rozeboom *et al.*, 2000).

2.3.3. Temperatura, pH e pressão osmótica do sêmen

A temperatura do sêmen deve ser aferida e registrada, e se encontra, normalmente, entre 35°C a 37°C. Assim, qualquer ejaculado com temperatura de 34°C ou menor deve ser descartado. O sêmen coletado deve ser mantido em banho-maria durante toda a avaliação, que não deve demorar mais que 15 minutos. Qualquer flutuação na temperatura do sêmen leva a redução de sua viabilidade, sendo que flutuações entre 2°C a 3°C provocam uma redução de 24 horas na longevidade do ejaculado (Trejo, 2004).

A maior sensibilidade às mudanças de temperatura deve-se à estrutura da membrana plasmática dos espermatozoides, principalmente da sua composição lipídica (baixa relação colesterol:fosfolípidos insaturados). Assim, havendo uma redução da temperatura, os movimentos laterais dos fosfolípidos são reduzidos, levando a separação de fases e alteração irreversível das proteínas da membrana (Trejo, 2004).

O pH do sêmen do varrão tem grande variação de acordo com a fração do ejaculado. A fração espermática rica apresenta um pH variando de 6,8 a 7,4, sendo que na fração pós espermática o pH varia entre 7,0 e 7,6. No laboratório, a avaliação do pH do ejaculado deve ser feita de forma rotineira, uma vez que desta forma pode-se detectar algum tipo de alteração, como por exemplo, contaminação bacteriana (Gadea, 2003).

Strzenzek *et al.*, (1995) determinaram o pH do sêmen de varrões de quatro raças diferentes, com os seguintes resultados sendo encontrados: varrões Landrace - $7,1 \pm 0,06$; Yorkshire - $7,1 \pm 0,07$; Duroc - $7,1 \pm 0,07$ e Chester - $6,9 \pm 0,08$.

Ejaculados que apresentam pH > 8,0 no momento da coleta apresentam, provavelmente, uma qualidade inferior e/ou

infecção no sistema genital ou nas glândulas sexuais acessórias. Mudanças de pH influenciam negativamente a viabilidade e motilidade espermáticas (Frunza *et al.*, 2008). No sêmen fresco do varrão, o pH varia de 7,2 a 7,5, sendo que em pH mais ácido a motilidade e o metabolismo dos espermatozoides são reduzidos. A grande quantidade de glicose presente na maioria dos diluidores de sêmen suíno causa uma considerável redução do pH intracelular para valores menores que 6,0. Esta acidose intracelular possibilita a sobrevivência das células espermáticas durante alguns dias de estocagem (Johnson *et al.*, 2000).

A osmose é o fenômeno observado quando uma solução é separada de um solvente por uma membrana permeável, consistindo da difusão do solvente em direção à maior concentração de soluto através de uma membrana semipermeável (Sten-Knudsen, 2002).

As membranas biológicas oferecem diferentes permeabilidades para diferentes solutos, sendo por esse motivo classificadas como semipermeáveis (Sten-Knudsen, 2002). Além disso, uma solução é classificada como isotônica quando sua osmolaridade é similar à do plasma sanguíneo, ou seja, de aproximadamente 300 mOsm kg^{-1} (Schilling e Vengust, 1986).

A tolerância osmótica é um dos mecanismos relacionados à resistência espermática durante a criopreservação (Curry e Watson, 1994; Johnson *et al.*, 2000), uma vez que os procedimentos de congelamento e descongelamento causam grande estresse osmótico aos espermatozoides, prejudicando, potencialmente, a sua função com consequente redução da sua sobrevivência (Pukazhenthii *et al.*, 2000). O choque osmótico afeta a difusão de fosfolípidios na dupla camada da membrana espermática (Christova *et al.*, 2002), enquanto um aumento na pressão osmótica do meio,

reduz a motilidade e danifica o acrossoma (Liu e Foote, 1998).

Niwa (1961) encontrou uma pressão osmótica no sêmen do varrão de 315 ± 8 mOm, enquanto Mann (1964), observou valores de 290 a 345 mOm.

2.3.4. Motilidade e vigor espermáticos

A motilidade deve ser avaliada o mais rápido possível após a coleta. Mudanças bruscas de temperatura, exposição à luz solar, desinfetantes, água, etc., irão todos afetar as células espermáticas negativamente (Shibley, 1999). O ejaculado normal do varrão deve conter acima de 70% de espermatozoides com motilidade progressiva. O exame e utilização do sêmen rapidamente, ou seja, com menos de 24 horas após a coleta, realizada em um estudo recente, indicam que as taxas de parto e o tamanho da leitegada diminuíram quando a motilidade inicial foi menor que 62,5% (Rozeboom *et al.*, 2000).

A motilidade espermática é um dos parâmetros mais frequentemente usados para avaliar a qualidade de um ejaculado (Flowers, 1997; Rigau *et al.*, 2002). No entanto, ainda é controversa a existência de correlação entre motilidade e capacidade de fertilização, mensurada como taxa de fertilidade e de não retorno ao estro dentro de 60 dias (Berger *et al.*, 1996; Pérez-Llano *et al.*, 2001).

Vários estudos têm demonstrado que espermatozoides com função normal, incluindo motilidade, viabilidade, taxas de fertilização e de clivagem inicial pode possuir DNA danificado, o que irá resultar em fertilidade reduzida e aumento de perda embrionária precoce (Bathgate, 2008).

A motilidade pode ser avaliada de forma subjetiva, quando feita visualmente sob microscópio óptico (Shibley, 1999), ou através de avaliações objetivas, quando

realizada utilizando métodos computadorizados que registram vários indicadores de movimentos espermáticos, tais como velocidade, tipo de movimento, trajetória percorrida e deslocamento angular. Para isto, tem sido utilizado o sistema CASA (Computer-assisted semen analysis) (Córdova-Izquierdo *et al.*, 2007).

Flowers (1997) concluiu que a percentagem de espermatozoides móveis apenas confere uma estimativa qualitativa de fertilidade, sendo útil apenas para estimar o desempenho reprodutivo do ejaculado do varrão quando possui menos de 60% de células móveis.

Xu *et al.* (1998) não encontraram correlação entre a motilidade espermática e o tamanho da leitegada, quando utilizaram 3 e 2×10^9 de espermatozoides/dose inseminante. No entanto, Tardif *et al.* (1999) afirmaram que quando $0,3 \times 10^9$ espermatozoides foram usados por dose, a percentagem de células com motilidade normal apresentou alta correlação positiva com a taxa de parto.

A motilidade é avaliada individualmente e indica a capacidade de movimento dos espermatozoides. A avaliação é quantitativa e também qualitativa, ou seja, avalia-se a percentagem de espermatozoides em movimento (0-100%) e a qualidade (vigor) em uma escala de 0 a 5, de acordo com o tipo de movimento: 0: imóveis ou mortos; 1: girando, sem movimento progressivo; 2: movimentos anormais, algumas vezes progressivo; 3: movimento progressivo lento e ondulatório. 4: com movimento progressivo rápido; 5: com movimento progressivo retilíneo muito rápido (Córdova-Izquierdo *et al.*, 2007).

No entanto, a avaliação da motilidade é subjetiva e depende do observador. Claramente, a precisão com que as estimativas são feitas é importante. O coeficiente de correlação é maior quando uma média de várias observações é usada (Foote, 2003). A motilidade espermática do

varrão tem sido avaliada através do CASA. Em estudos iniciais não houve correlação entre os parâmetros de motilidade avaliados pelo CASA com a fertilidade (Aumuller e Willeke, 1988; Rath *et al.*, 1988). Recentemente, resultados de estudos envolvendo fertilidade demonstraram uma correlação da motilidade aferida objetivamente com os resultados das inseminações a campo (Holt *et al.*, 1997). No estudo de Hirai e colaboradores (2001), o uso do CASA permitiu a observação de maior percentagem de espermatozoides móveis (87%).

Pode ser assumido que os parâmetros seminais padronizados, como motilidade, morfologia e concentração espermática são insuficientes para indicarem mudanças nas células espermáticas submetidas a diluição, resfriamento, etc. Desta forma, a análise funcional espermática deve ser usada para determinar os danos mínimos iniciais, físicos e/ou bioquímicos, associados a falhas na atividade metabólica. Estes testes funcionais incluem a avaliação da cinemática dos espermatozoides, utilizando-se o CASA, bem como avaliações de danos primários na membrana espermática, na estrutura da cromatina, no DNA, etc. (Holt *et al.*, 2007; Petrunkina *et al.*, 2007).

O sistema CASA tem sido introduzido comercialmente para avaliações rotineiras de motilidade devido a sua habilidade em identificar objetivamente parâmetros de motilidade espermática e de movimento (Didion, 2008). No entanto, na prática, o uso dos valores médios de motilidade simplifica a análise, mas não leva em consideração a variação interna, fornecendo informação enganosa sobre a qualidade espermática, a qual não é revelada pelas medidas estatísticas usuais (Holt *et al.*, 2007).

2.3.5. Aglutinação espermática

A aglutinação espermática é observada quando o espermatozóide se liga a outro pela cabeça ou pela cauda (Yeste *et al.*, 2008a), podendo ser observada durante a avaliação do sêmen fresco ou diluído ao microscópio (Trejo, 2004). Avalia-se a aglutinação simultaneamente à mensuração da motilidade espermática, sendo que os espermatozoides aglutinados podem estar vivos ou mortos. Podem, ainda, encontrar-se unidos às células epiteliais (Trejo, 2004).

A qualificação das aglutinações pode ser feita de várias maneiras, utilizando-se percentagens, sistema de pontuação (1 a 5), ou apenas adjetivos (leve, média, alta) (Kubus, 2010).

A observação de alto percentual de aglutinação leva à redução do número de espermatozoides disponíveis para a fertilização (Rozeboom, 2000; Córdova-Izquierdo, 2005). Assim, é importante considerar o grau de aglutinação quando se calcula a concentração de um ejaculado, pois os espermatozoides aglutinados, geralmente, se dissociam após a diluição do sêmen, antes da mensuração da concentração. Desta forma, o número de espermatozoides viáveis nas doses inseminantes pode ser subestimado (Rozeboom, 2000).

As aglutinações podem ser causadas por mudanças no pH do sêmen, choque térmico, contaminação bacteriana, concentração espermática elevada, ou ainda pela presença de partículas, incluindo a presença do gel das glândulas bulbouretrais, devido a falha no processo de filtragem durante a coleta do sêmen (Rozeboom, 2000; Córdova-Izquierdo, 2005; Kubus, 2010). Yeste *et al.* (2008a) sugeriram que as aglutinações, quando frequentemente observadas, estão associadas a uma causa de infertilidade imunológica. Vale salientar também que

períodos prolongados de estocagem induzem o aparecimento de aglutinações.

A avaliação das aglutinações isoladamente não é suficiente para desqualificar um ejaculado. Diante disto, é importante que outras avaliações do espermiograma sejam consideradas (Kubus, 2010).

2.3.6. Concentração espermática

O número de espermatozoides em uma dose de sêmen é importante para o sucesso da fertilização. Em contrapartida, as centrais de IA tendem a diluir o ejaculado tanto quanto possível para maximizar a produção de sêmen (Vyt, 2007).

A determinação da concentração nada mais é do que a quantificação do número de espermatozoides por unidade de volume do ejaculado, sendo seu valor médio de 100×10^6 ($150-250 \times 10^6$) espermatozoides por mL do ejaculado (Córdova-Izquierdo, 2005).

Tem sido descrita uma grande variação entre diferentes raças, quanto ao número de espermatozoides do ejaculado (Kommissrud *et al.*, 2002), sendo este o principal fator capaz de influenciar o número de doses produzidas. As diferenças não existem apenas quanto ao número de espermatozoides, mas também com relação ao volume do ejaculado (Kondracki, 2003), ambas capazes de influenciar a concentração espermática do sêmen. A variação individual dentro de uma mesma raça é também importante (Johnson *et al.*, 2000).

A orientação geral para o número de espermatozoides contidos em uma dose de sêmen foi estabelecida em 3×10^9 espermatozoides por dose (Alm *et al.*, 2006). Entretanto, este número deve ser adaptado de acordo com a motilidade e a morfologia do ejaculado (Martín-Rillo *et al.*, 1996). Tudo isso reflete a importância

do cálculo acurado da concentração (Vyt, 2007).

A mensuração da concentração espermática não é componente da avaliação da qualidade espermática. No entanto, é uma ferramenta importante para monitorar a saúde e o potencial reprodutivo do varrão (Rozeboom, 2000).

Existem vários métodos para se avaliar a concentração espermática (Córdova-Izquierdo, 2005), podendo inicialmente ser avaliada pela inspeção da cor e aspecto do ejaculado bruto. Por este procedimento, em um ejaculado aquoso opalescente, espera-se uma concentração espermática variando de $0-200 \times 10^6$ espermatozoides/mL. Quando o ejaculado se apresenta leitoso, a concentração varia de $200-500 \times 10^6$ espermatozoides/mL. Finalmente, em ejaculados cremosos espera-se uma variação na concentração de $500-1000 \times 10^6$ espermatozoides/mL (Shipley, 1999). No entanto, este método é impreciso e muito subjetivo, não sendo adequado para o uso em centrais de IA (Vyt, 2007).

A maneira mais prática para se determinar a concentração espermática é através da contagem direta em câmara de Neubauer (hemocitômetro) (Córdova-Izquierdo, 2005). Outros hemocitômetros, como as câmaras de Thomas e Burker são câmaras de vidro reutilizáveis com volume fixo e utilizadas para contar espermatozoides imobilizados. Câmaras descartáveis, como a Microcell[®] e Leja[®], tem profundidade fixa de $20\mu\text{m}$ e são usadas tanto para a determinação da concentração quanto da motilidade, sendo comumente usadas no sistema CASA, uma vez que a sua pequena profundidade limita a movimentação na terceira dimensão (Verstengen *et al.*, 2002).

Os hemocitômetros são considerados como o método padrão para a determinação da concentração espermática, por apresentarem menor coeficiente de variação que as câmaras descartáveis (Tomlinson *et al.*, 2001). No entanto, a concentração

calculada pela contagem em hemocitômetro tende a ser maior que a concentração calculada através das demais câmaras, principalmente, quando se tratam de ejaculados ou de frações do ejaculado apresentando um número elevado de espermatozoides (Vyt, 2007).

Fotômetros e espectrofotômetros mensuram a densidade óptica do ejaculado, ou seja, a absorção relativa e dissipação de um feixe de luz que é enviado e passa através da amostra de sêmen. A absorção e a dissipação são proporcionais à concentração espermática. Ambos são comumente usados por serem métodos mais rápidos e mais fáceis, embora a absorção possa também ser influenciada por partículas de gel no plasma seminal ou diluidor, pela taxa de diluição e pela qualidade da amostra (Vyt, 2007).

A citometria de fluxo também pode ser usada, possuindo baixo coeficiente de variação. Esta técnica conta com a utilização de corantes fluorescentes que coram de maneira distinta espermatozoides intactos ou danificados. No entanto, é um método caro e depende de pessoas qualificadas para seu uso na prática (Vyt, 2007).

O sistema CASA analisa imagens para determinar a concentração espermática dentro das câmaras de contagem, sendo que a sua acurácia depende não apenas das propriedades ópticas e do software usado, mas também do tipo de câmara utilizada (Verstegen *et al.*, 2002).

A frequência de ejaculação tem efeito significativo sobre as características seminais, principalmente sobre o volume do ejaculado e a concentração de espermatozoides/mL (Córdova-Izquierdo, 2005; Smital, 2009). Cameron (1985) demonstrou que um maior número de espermatozoides será liberado se as coletas forem realizadas três vezes por semana, em comparação a um sistema de coletas a cada 48 ou 24 horas. No mesmo sentido, Reed (1982) demonstrou que o número máximo

de espermatozoides poderá ser coletado se os varrões forem submetidos a coletas em intervalos de 4-5 dias. Além disso, a fertilidade de varrões depende do tempo e sofre alterações durante o desenvolvimento do animal. O início precoce da atividade reprodutiva em varrões irá resultar em queda da fertilidade durante toda a vida reprodutiva dos mesmos (Smital, 2009).

Falkenberg *et al.* (1992) reportaram que os varrões alcançam uma produção espermática ótima ao final do crescimento corporal, ou seja, com aproximadamente 2,5-3,0 anos. Desta forma, tanto o volume do ejaculado quanto a concentração são afetados pela idade.

No sistema atual de inseminação de suínos, a intensidade sexual pode ser considerada como um dos principais fatores influenciando a fertilidade de varrões (Smital, 2009). Nesse sentido, Córdova-Izquierdo (2005) aconselhou que fossem realizadas no máximo três coletas/semana em machos jovens, e em animais adultos, com idade superior a nove meses, cinco coletas/semana. Para Falkenberg e colaboradores (1992), o intervalo ideal entre coletas é de 2-5 dias, de forma que uma frequência maior de ejaculação tende a reduzir a concentração e também a libido. Da mesma forma, Smital (2009) afirmou que a concentração e o número total de espermatozoides no ejaculado foi restabelecido após 5-7 dias de descanso após a última coleta. Entretanto, o completo restabelecimento da concentração espermática só foi alcançado após um repouso sexual de 10-11 dias.

2.3.7. Morfologia espermática

O conhecimento sobre a estrutura espermática tem suas origens no século XVII, quando Anton van Leeuwenhoek comunicou pela primeira vez a existência de numerosos “*animacula*” no fluido

seminal de animais e do homem. Ele reportou seus achados em uma carta submetida ao Royal Society de Londres, em novembro de 1677. Pesquisas intensivas nos séculos XVIII e XIX estabeleceram a origem testicular e o papel fundamental dos espermatozoides na fertilização. A introdução de técnicas morfológicas, bioquímicas e moleculares modernas associadas aos avanços da medicina reprodutiva durante o século XX resultou na caracterização de várias anormalidades espermáticas distintas (Chemes e Rawe, 2003).

A predição da fertilidade espermática tem grande importância econômica para rebanhos que usam a IA, uma vez que permite a seleção apenas de varrões que apresentam bom desempenho reprodutivo (Gadea, 2005).

A aparência microscópica dos espermatozoides pode fornecer informações sobre anormalidades morfológicas, incluindo a integridade da membrana plasmática e do acrossoma (Woelders, 1991), sendo que estes dois parâmetros contribuem para a capacidade fecundante dos espermatozoides.

Durante a avaliação morfológica, as alterações espermáticas são avaliadas e registradas para cada estrutura, separadamente. Os defeitos podem ocorrer em um ou mais segmentos da célula espermática de forma simultânea, de forma que quando o espermatozóide apresenta mais de um defeito em regiões distintas, apenas o defeito mais severo é considerado. Ao final da avaliação, realiza-se a soma das alterações observadas, sendo desejado que o total não ultrapasse os limites aceitáveis (Furtado *et al.*, 2006).

A complexidade da subfertilidade provocada pelo macho vem sendo destacada por muitos anos, baseando-se, principalmente, em investigações de campo envolvendo a fertilidade de touros (Saacke, 2008). Nesse sentido, Sullivan e Elliot

(1968) também demonstraram que o número mínimo de espermatozoides móveis necessários para a máxima fertilidade (limiar) diferiu entre touros. Além disso, observou-se que os touros diferiram quanto à fertilidade máxima, qualquer que fosse a concentração utilizada por dose inseminante. Segundo os autores, a necessidade de maior concentração espermática em touros subférteis deveu-se à presença de espermatozoides morfológicamente anormais.

Existem várias classificações relacionadas aos defeitos morfológicos dos espermatozoides, baseando-se na origem e na gravidade dos mesmos (Barth e Oko, 1989).

Reconhece-se, atualmente, que as deficiências seminais refletidas na redução das taxas de concepção podem ser classificadas como compensáveis e não compensáveis. Os espermatozoides anormais podem reduzir a fertilidade de duas maneiras, por não conseguirem chegar ao local de fertilização, ou por serem incompetentes no processo de fertilização dos oócitos e na manutenção do desenvolvimento embrionário (Saacke *et al.*, 2000). Dessa forma, as diferenças seminais entre machos quanto ao número de espermatozoides necessários para alcançar taxas de concepção máximas são consideradas compensáveis. Uma vez que a taxa de concepção máxima de um macho é alcançada, e que qualquer aumento no número de espermatozoides inseminados não pode refletir em aumento destas taxas, as diferenças observadas nelas devido ao macho são consideradas não compensáveis (Saacke *et al.*, 2000).

Pace *et al.* (1981) observaram que alguns parâmetros de viabilidade espermática podem ser considerados como compensáveis, incluindo a percentagem de espermatozoides com motilidade progressiva e a percentagem de espermatozoides com membrana plasmática

e acrossômica intactas. Acima de um limiar, eles demonstraram que há um número destas células na dose inseminante que é importante para a taxa de gestação. Além disso, a população de espermatozoides que alcançava o local de fertilização após a inseminação era, aproximadamente, 100% de vivos. Espermatozoides imóveis, com defeitos de cauda ou gotas citoplasmáticas eram marcadamente reduzidos no sistema genital feminino, havendo impedimento de seu acesso ao local da fertilização. Morfologicamente, os espermatozoides parecem ser excluídos do contato com o ócito mais pela severidade da patologia que pelo tipo da mesma (Overstreet *et al.*, 1978).

A importância das características compensáveis para a IA reside no fato de que estas governam o número mínimo de espermatozoides necessários para que uma dose inseminante alcance máxima fertilidade (Saacke *et al.*, 2000).

Com relação aos parâmetros seminais não compensáveis, observações em várias espécies indicam que fatores associados com a redução da qualidade espermática, como as envolvendo viabilidade e morfologia, resultam em embriões de baixa qualidade ou em morte embrionária precoce (Barth, 1992). Isto sugere incompetência espermática após a fertilização, relacionada ao uso de sêmen de baixa qualidade. São, então, deficiências que não poderiam ser eliminadas apenas com o aumento da concentração da dose inseminante, sugerindo serem estas deficiências não compensáveis. Espermatozoides com deformidades de cabeça, com vacúolos nucleares (crateras, diademas, “pouch formation”) podem alcançar os ócitos após a IA. Além disso, ejaculados com espermatozoides apresentando estes defeitos, produzem, frequentemente, baixas taxas de fertilização e embriões de baixa qualidade (Saacke *et al.*, 1994).

Donadeu (2004) classificou como primárias as anormalidades na forma da cabeça, que carrega o material genético, ou na bainha mitocondrial, que é importante no controle da função flagelar. Estas anormalidades não podem ser compensadas pelo aumento do número de espermatozoides inseminados. As anormalidades restantes do citoplasma, gotas proximais ou distais e pequenas anormalidades da cauda são definidas como secundárias, e podem ser compensadas. Além disso, as alterações morfológicas causadas pelo processamento do sêmen (isto é, cauda enrolada), são denominadas anormalidades terciárias (Oyeyemi e Ubiogoro, 2005).

Os defeitos espermáticos podem ainda ser classificados como primários ou secundários. São classificados como primários os oriundos de falhas na espermatogênese, e como secundários os desenvolvidos após a espermição. É importante ressaltar que os defeitos primários são considerados mais graves que os secundários (Barth e Oko, 1989).

Bloom (1983) classificou os defeitos espermáticos de acordo com o grau de severidade para a fertilidade do macho, dividindo-os em maiores e menores. Dessa forma, defeitos maiores são todos aqueles que irrevogavelmente determinam prejuízos à fertilidade do macho, classificando-se como defeitos menores aqueles que não são tão prejudiciais.

A avaliação morfológica dos espermatozoides através do microscópio é considerada como uma excelente contribuição à predição da fertilidade em varrões (Córdova-Izquierdo *et al.*, 2007). O exame de morfologia espermática faz parte da avaliação qualitativa do ejaculado e permite a determinação da frequência de cada uma das anormalidades espermáticas, bem como do percentual total de alterações em uma determinada amostra de sêmen. Além disso, tem sido utilizado como indicativo do potencial fecundante do

ejaculado, uma vez que pode haver alteração da capacidade de movimentação e fecundação dos espermatozoides, de acordo com a localização do defeito (Bortolozzo *et al.*, 2005c). As anormalidades morfológicas indicam aberrações na espermatogênese (Vyt, 2007).

Os testes *in vitro* usados rotineiramente para a avaliação da qualidade espermática são associados com três parâmetros qualitativos do sêmen: viabilidade espermática, morfologia e funcionalidade. Dentre as características seminais avaliadas em laboratório, apenas a percentagem de espermatozoides com morfologia normal foi positivamente correlacionada com o tamanho da leitegada ($R^2=0,59$) (Xu *et al.*, 1998).

A coloração não é necessária quando a avaliação for feita utilizando-se microscopia de interferência diferencial, embora seja necessária quando da utilização de microscopia de luz (Shiple, 1999). Embora várias colorações possam ser utilizadas, procura-se utilizar aquelas que permitem a combinação do exame morfológico com a avaliação da integridade da membrana. Neste sentido, utiliza-se corantes que são excluídos por células vivas, como a eosina. Desta forma, além de facilitar a avaliação morfológica, a coloração por eosina-nigrosina pode ser usada para discriminar células vivas e mortas (Vyt, 2007). O uso de microscopia de contraste de fase e glutaraldeído ou formol em preparações úmidas é recomendada, uma vez que evita os artefatos associados a preparações secas (Pursel *et al.*, 1972).

A avaliação morfológica deve ser realizada sob microscópio com aumento de 1000x. O sêmen normal não deve conter nenhum sangue, pus ou outros materiais estranhos. Caso contenha, um diagnóstico mais profundo deve ser realizado. O número mínimo de espermatozoides examinados é 100, que serão então classificados como

normais ou anormais. A idade do varrão deve ser levada em consideração, uma vez que varrões jovens (6-7 meses de idade) terão maior proporção de anormalidades, principalmente gotas citoplasmáticas e cabeças anormais (Shiple, 1999).

Normalmente, o ejaculado do varrão adulto possui acima de 80% de espermatozoides morfolologicamente normais, com menos de 10%-15% de prevalência de gotas citoplasmáticas proximais e distais (Althouse *et al.*, 1998).

Para Waberski *et al.* (1994a), os percentuais máximos de anormalidades primárias e secundárias permitidos são de 10% e 20%, respectivamente. Por outro lado, a percentagem mínima de espermatozoides normais deve ser de 70% (Waberski *et al.*, 1994a; Flowers, 1997; Shiple, 1999; Vyt, 2007).

Vyt (2007) afirma que o total de anormalidades morfológicas não deve exceder 25% quando o macho é usado para monta natural e 20% para machos utilizados em programas de IA. Este total deve incluir tanto gotas citoplasmáticas proximais (GCP) quanto distais (GCD).

Gotas citoplasmáticas (GC) são definidas como o restante do citoplasma original das espermátides que continua ligado ao espermatozóide após a espermição (Fawcett e Ito., 1965).

A avaliação ultraestrutural da GC revelou numerosos elementos vesiculares circundados por uma membrana plasmática intacta (Kaplan *et al.*, 1984). Várias enzimas glicolíticas têm sido localizadas nas GC, o que sugere sua relação com a atividade lisossomal (Harrison e White, 1972). Anticorpos para lipoxigenase, uma enzima capaz de lesar a membrana celular através da peroxidação, reconhecem antígenos na GC dos espermatozoides do touro e do varrão (Fischer *et al.*, 2002). Isso pode estar relacionado à debilidade estrutural da membrana espermática no

local onde as gotas se encontram. Desta forma, o aumento da fragilidade neste local, possibilitaria o giro simples ou o enrolamento da cauda do espermatozóide (Cooper e Yeung, 2003; Kuster *et al.*, 2004).

Muitos autores têm questionado a significância de gotas citoplasmáticas para a fertilidade do varrão (Althouse *et al.*, 1998). De acordo com Vyt (2007), as GCD não são relacionadas à redução da fertilidade, exceto quando há aumento simultâneo na percentagem de espermatozoides com GCP.

Vários estudos têm demonstrado uma correlação negativa entre a percentagem de espermatozoides com gotas citoplasmáticas e as taxas de parto e número de leitões nascidos vivos (Zeuner, 1992).

Uma vez que as gotas citoplasmáticas representam, geralmente, a alteração morfológica mais frequente no ejaculado do varrão, Waberski *et al.* (1994a) investigaram o efeito das GCP e GCD na fertilidade, em um experimento realizado a campo. Os autores encontraram uma correlação negativa entre a proporção de GCD e a fertilidade, o que contradiz a afirmação de serem estas menos prejudiciais à fertilidade do que as GCP (Hurtgen, 1984).

A retenção de gotas citoplasmáticas é provavelmente um defeito primário, de origem testicular, quando há impedimento da migração fisiológica da gota durante o trânsito espermático no epidídimo (Johnson *et al.*, 2000). A identificação da P450 aromatase nas GC de várias espécies sugere a participação de estrógenos na regulação da maturação espermática no epidídimo (Janulis *et al.*, 1996).

As GC migram da posição proximal para a distal durante sua maturação na porção distal da cabeça e proximal do corpo do epidídimo, sendo normalmente liberada dos espermatozoides do varrão durante ou logo

após a ejaculação (Larson *et al.*, 1980; Kato *et al.*, 1996). No varrão, 70% a 90% dos espermatozoides presentes na cauda do epidídimo retém GCD (Herms *et al.*, 1988). Já para Kato *et al.* (1996), este valor é de 97% para espermatozoides presentes na cauda do epidídimo, e 93% para aqueles oriundos do ducto deferente.

Waberski *et al.* (1994a) concluíram que a presença de GC é um defeito morfológico grave, de particular importância quando o sêmen é armazenado por longos períodos para o uso em IA. Além disso, podem ser associadas a menor resistência dos espermatozoides ao envelhecimento quando armazenados *in vitro* (Larsson *et al.*, 1984; Johnson *et al.*, 2000). Vale salientar, ainda, que os espermatozoides do varrão com GC têm redução da afinidade de ligação ao epitélio da tuba uterina *in vitro* (Petrunkina *et al.*, 2004).

As gotas podem ser encontradas em todos os ejaculados e em todas as frações do ejaculado, estando presentes em maior proporção na fração inicial (Furtado *et al.*, 2006). A d-frutose, um componente do fluido das vesículas seminais, pode ser responsável pela liberação normal das GCD nos espermatozoides do varrão (Harayama *et al.*, 1996).

Althouse *et al.* (1998) afirmam que uma elevada incidência de GCD tem sido descrita juntamente com membranas plasmáticas alteradas em varrões submetidos a estresse térmico.

O efeito mais óbvio do estresse térmico é na morfologia espermática. Assim, ao estudar-se o intervalo da exposição ao calor ao aparecimento das anormalidades morfológicas, considerando-se o ciclo espermato gênico do varrão, demonstrou-se que as células espermato gênicas mais afetadas foram as espermátides arredondadas e alongadas, além dos espermátocitos terciários (Swierstra, 1968; Cameron, 1980). O aumento significativo da percentagem de espermatozoides com

GC, 3-5 semanas após o tratamento, pode ser devido ao efeito em espermátocitos primários, interferindo com a liberação da gota durante o trânsito epididimário, ou devido ao efeito de períodos prolongados de calor no epidídimo (Cameron, 1980). Os danos acrossomais são similares aos descritos por Pursel *et al.* (1972), quando os espermatozoides foram submetidos ao choque térmico.

Geralmente, a severidade dos danos seminiais está diretamente relacionada à duração da exposição ao calor. Entretanto, em alguns varrões a incidência de cabeças e caudas anormais pode estar relacionada à elevação da temperatura retal, independentemente do tempo de exposição ao calor (Cameron, 1980). Egbunike e Elemo (1978) observaram que os varrões europeus podem se adaptar ao clima tropical, sem prejuízos à produção espermática normal. Da mesma forma, no estudo de Cameron (1980), os varrões mantidos em temperaturas de 30°C necessitaram de exposição aguda a temperaturas de 35°C ou mais antes que a espermatogênese fosse adversamente afetada.

Está bem estabelecido que quando a temperatura excede os 29°C, aditivamente a uma umidade relativa do ar de 85%, por período superior a 10 dias, a espermatogênese é negativamente afetada (Sonderman e Luebbe, 2008).

A presença de GCP é considerada normal e transitória em machos jovens, ou seja, com idade inferior a 12 meses, tendendo a desaparecer quando o reprodutor atingir a estabilidade na produção espermática, com aproximadamente 12 meses de idade.

A coleta excessiva dos machos pode provocar um aumento percentual de gotas citoplasmáticas (Furtado *et al.*, 2006). Pruneda *et al.* (2005) submeteram três machos a uma alta frequência de coleta de sêmen, correspondente a duas coletas por dia, a intervalos de 12 horas, denominado

como grupo estressado. Três machos foram submetidos a uma coleta a cada dois dias, compondo o grupo controle. Neste estudo, foi determinado que a frequência de espermatozoides com GCP e gotas intermediárias encontradas na porção distal da cauda do epidídimo e nos ejaculados dos varrões do grupo estressado foi 40% superior aos do grupo controle. Concluiu-se, assim, que a alta frequência de coletas resultou em anomalias na migração das GCP dos espermatozoides do varrão. Além disso, o estudo detalhado de anormalidades espermáticas demonstrou que a frequência de espermatozoides com anormalidades na cabeça e na cauda permaneceu constante ao longo do epidídimo e nos ejaculados do grupo controle (aproximadamente 10% e 7%, respectivamente).

Além disso, a frequência de espermatozoides com defeitos de tamanho de cabeça, na forma da cabeça e na cauda, bem como no número de caudas foi próxima de zero neste grupo. Em contrapartida, a frequência de espermatozoides com formato anormal de cabeça e cauda, oriundos de todas as regiões do epidídimo, e nos ejaculados dos varrões estressados foi maior. Verificou-se, ainda, maior frequência de espermatozoides com anomalias no número de cabeças e de caudas, encontrados na cabeça e cauda do epidídimo e também nos ejaculados destes varrões.

Resultados de pesquisas suportam a importância da avaliação rotineira da morfologia espermática. Desta forma, quando o sêmen coletado apresentar menos de 70% de espermatozoides morfológicamente normais deve ser classificado como inferior. Uma vez que há grande variação entre varrões na deterioração morfológica do sêmen, durante a sua estocagem, o padrão inicial do sêmen previamente ao processamento deveria exigir mais que 70% dos espermatozoides com morfologia normal, principalmente quando o sêmen é usado após 24 horas de

armazenamento ou mais (Rozeboom, 2000). Além disso, a incidência de GC não deve exceder 15%, principalmente quando o sêmen é armazenado por maior período de tempo (pelo menos dois dias) (Rozeboom *et al.*, 1999; Rozeboom, 2000, Althouse, 2010).

Algumas pesquisas sugerem ainda que a integridade do acrossoma pode ser um melhor indicador da qualidade espermática do que a motilidade. A integridade acrossomal pode ser avaliada sob óleo de imersão com microscópio de contraste de fase para que as “camadas” do acrossoma possam ser avaliadas separadamente. Ejaculados com menos de 51% de acrossomas intactos podem ser considerados ruins (Rozeboom, 2000).

Além da avaliação morfológica visual, o sistema automatizado CASA foi

desenvolvido para obter informações mais objetivas (Verstegen *et al.*, 2002). O Sistema de Avaliação Automatizada de Morfologia Espermática ou ASMA (Automated Sperm Morphology Analysis System) é capaz de localizar a cabeça dos espermatozoides e comparar sua morfologia de acordo com padrões internos. Sua desvantagem é o longo tempo de avaliação necessária para cada amostra (Kruger *et al.*, 1993; Verstegen *et al.*, 2002), além desta avaliação ser parcialmente dependente do contraste das células com o fundo, necessário para o sistema reconhecê-las (Vyt, 2007).

2.3.8. Resumo dos parâmetros seminais mínimos de qualidade do ejaculado do varrão

Tabela 2: Parâmetros seminais mínimos de qualidade I

Parâmetros Seminais	Padrão mínimo de qualidade
Volume (mL)	50
Temperatura	34°C
pH	6.8
Cor (única aceitável)	Branca
Motilidade geral	85%
Concentração espermática	100 x 10 ⁶
Aglutinações (% de espermatozoides não aglutinados)	75%
Proporção de vivos e mortos	65% de espermatozoides vivos
Morfologia (% de espermatozoides normais)	80%

Fonte: Adaptado de Trejo (2004)

Tabela 3: Parâmetros seminais mínimos de qualidade II

Parâmetros Seminais*	Valores Mínimos			
	Kuster e Althouse ¹	Martin-Rillo et al. ²	Shipley ³	Britt et al. ⁴
Motilidade (%)	>70	60-100	>70	>60
Morfologia Anormal (%)	<20	—	<20	—
Acrossomas Normais (%)	—	70-100	—	—
GC (%)	<15	—	<15	—
GCP (%)	—	0-20	—	—
GCD (%)	—	0-30	—	—
Cauda enrolada (%)	—	0-4	—	—
Defeitos Primários (%)	—	—	—	<10
Defeitos Secundários (%)	—	—	—	<20

Fonte: Adaptado de Vyt (2007) - ¹ 1999; ² 1996; ³ 1999; ⁴ 1999;

* Recomendações para doses contendo 2×10^9 de espermatozoides por dose

2.4. Fatores a serem considerados no processo de resfriamento e/ou transporte do sêmen diluído de suínos

2.4.1. Variação individual de varrões

A herdabilidade é a precisão por meio da qual o valor fenotípico representa o valor genético do indivíduo, podendo variar de 0,0 a 1,00 ou de 0 a 100%. Quando a herdabilidade for de 0,0 a 0,20 é considerada baixa. Valores baixos significam que grande parte da variação da característica é devida às diferenças ambientais entre os indivíduos, enquanto valores altos (>0,40) implicam que diferenças genéticas entre indivíduos são responsáveis pela variação da característica avaliada. De modo geral, as características reprodutivas apresentam baixa herdabilidade (Lopes, 2011).

Na produção de suínos, a maioria dos animais resulta do cruzamento entre matrizes de linhagens maternas com sêmen heterospérmico de machos de terminação. Estes varrões são selecionados quase que exclusivamente para crescimento e características de carcaça, dando-se uma

ênfase mínima ao volume, qualidade e fertilidade do sêmen. Consequentemente é razoável especular que o verdadeiro mérito genético da grande maioria dos varrões comerciais com relação aos parâmetros reprodutivos não é conhecido. Desta forma, uma importante questão a se considerar é quanta variação existe nos parâmetros reprodutivos de machos de linhagens de terminação utilizados atualmente na produção de suínos. Do ponto de vista prático, a quantidade e a qualidade do sêmen são os dois principais fatores que afetam o número de doses que podem ser produzidas a partir de um único ejaculado, e que podem afetar os custos associados à utilização da IA (Flowers, 2008).

Vários estudos envolvendo múltiplas linhagens genéticas têm reportado a existência de grandes variações quanto à qualidade e quantidade da produção seminal de varrões. De acordo com pesquisas realizadas em universidades e em criações comerciais, varrões híbridos produzem, normalmente, sêmen de melhor qualidade e também maior volume, seguidos pelos de linhas terminais puras. Em último lugar estão situados os varrões oriundos de linhas maternas puras (Sonderman e Luebbe, 2008).

As diferenças observadas incluem: sensibilidade à infertilidade sazonal, interação volume do ejaculado x idade, frequência ótima de coleta, taxa de ejaculados descartados, idade à puberdade, libido, facilidade de treinamento para a coleta e, finalmente, a resistência do sêmen durante a estocagem (Sonderman e Luebbe, 2008).

Existem diferenças entre as raças com relação à produção espermática, havendo, ainda, interações com a idade. Os varrões começam a ser coletados com aproximadamente 7-9 meses de idade. Estes varrões jovens, normalmente têm seus ejaculados descartados por baixos volume e concentração espermática. Logo após a sua coleta inicial, as linhas terminais (puras ou cruzadas) irão normalmente apresentar ejaculados admissíveis ou processáveis, embora as linhagens maternas pareçam atrasar aproximadamente 2-8 semanas para que atendam às mesmas exigências (Sonderman e Luebbe, 2008).

A produção espermática difere consideravelmente entre raças. Um dos estudos que avaliou tais diferenças foi realizado por Kennedy e Wilkins (1984). Neste estudo, avaliaram-se as características seminais de varrões puros em granjas canadenses durante 10 anos. Segundo os autores, varrões Yorkshire produziram, normalmente, $10-12 \times 10^9$ de espermatozoides a mais que os da raça Hampshire, sendo que os varrões das raças Landrace e Duroc produziram volumes intermediários. Outros estudos têm reportado ainda maiores diferenças quanto ao número total de espermatozoides por ejaculado, quando as comparações envolveram varrões europeus, chineses e africanos (Flowers, 2008).

Os custos fixos associados com a coleta do sêmen de varrões são altos, quando considera-se o modesto número de doses inseminantes produzidas por ejaculado. Consequentemente, tecnologias que

permitam a identificação de varrões com testículos maiores e que produzam um maior número de doses por coleta poderiam reduzir os custos de produção em sistemas que usam a inseminação artificial (Ford *et al.*, 2006). Diferenças no número de espermatozoides por ejaculado podem variar até três vezes entre raças (Kennedy e Wilkins, 1984; Colenbrander *et al.*, 1993), observando-se uma maior produção espermática nas raças encontradas, normalmente, em sistemas intensivos de produção (Ford *et al.*, 2006).

A produção espermática aumentou até os dois anos de idade, em resposta à seleção direta para tamanho testicular e também como consequência da heterose (Wilson *et al.*, 1977). No entanto, o completo entendimento das bases biológicas relacionadas às diferenças observadas na produção espermática entre raças não existe. Entretanto, o número de células de Sertoli quando da complementação da puberdade pode ser considerado como o fator limitante primário (Ford *et al.*, 2006).

Diferenças entre raças quanto ao desenvolvimento testicular pós-natal, contrastam com a similaridade presente no desenvolvimento durante o período pré-natal. A progressão do desenvolvimento testicular pré-natal de duas raças, Landrace-Yorkshire (LY – Composto branco) e Meishan, uma raça chinesa com testículos pequenos e com menor idade à puberdade do que os varrões LY foi comparada. De acordo com este estudo, a produção de hormônio anti-mulleriano ocorreu em 40%-50% dos machos dentro de cada raça, aos 26 dias de gestação, e em 100% dos machos de ambas as raças aos 28 dias de gestação. Da mesma forma, a presença do citocromo P450 17 alfa-hidroxilase/17,20 – liase, um indicador da síntese de esteróides pelas células de Leydig, foi observada em ambas as raças aos 30 dias de gestação. Entre os dias 30 e 50 de gestação, os fetos machos LY alcançaram pesos maiores do que os machos Meishan (Hunter, 1994), além de

possuírem maior peso testicular e massa de túbulos seminíferos aos 60 dias de gestação. O número de células de Sertoli foi consistentemente maior nos fetos LY do que nos fetos Meishan, sendo a magnitude desta diferença proporcional às diferenças observadas no tamanho dos testículos à maturidade entre as duas raças (Ford *et al.*, 2006). O aumento do número de células germinativas foi logarítmico durante a metade final da gestação (Van Straaten e Wensing, 1977).

No que concerne ao desenvolvimento testicular pós-natal, observou-se que durante os primeiros 25 dias após o nascimento, os varrões Meishan acumularam células de Sertoli e túbulos seminíferos mais rapidamente do que varrões LY, produzindo maior massa tubular, apesar do menor tamanho testicular. Os varrões Meishan mantiveram esta vantagem quanto à massa de túbulos seminíferos, em relação aos de outras raças, durante os primeiros 100 dias de vida (Ford *et al.*, 2006).

Um rápido aumento da massa tubular, com expansão do diâmetro dos túbulos seminíferos e aumento da taxa de acúmulo de células de Sertoli define o desenvolvimento púbere inicial dos machos, na maioria das espécies já estudadas (França *et al.*, 2005).

Varrões Meishan atingem a puberdade mais cedo, sendo esta caracterizada pelo aumento do diâmetro dos túbulos seminíferos aos 30-45 dias de idade, enquanto os varrões de outras raças exibem este aumento após os 100 dias de idade (França *et al.*, 2000).

Com relação aos determinantes genéticos relacionados à massa testicular, sabe-se, atualmente, que em ratos, apenas alguns genes tem impacto sobre o peso testicular, com herdabilidade de 0,52. Uma proporção significativa desta variação no peso testicular é normalmente atribuída ao cromossomo Y. Entretanto, estudos recentes determinaram que regiões

específicas do cromossomo X também afetam significativamente o peso dos testículos (Oka *et al.*, 2004). Em linhagens de varrões Landrace-Large White, a seleção direta para maior tamanho testicular aos 150 dias de idade levou a um aumento significativo do tamanho testicular de machos maduros, com consequente aumento da produção espermática diária (Ford *et al.*, 2006).

2.4.2. Tipo de colheita do sêmen: total ou fracionada

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

O principal objetivo das tecnologias reprodutivas modernas é aumentar a eficiência reprodutiva e as taxas de melhoramento genético. Estas tecnologias também oferecem potencial para expandir a multiplicação e o transporte de material genético, além da conservação de recursos genéticos únicos para uso futuro (Okere, 2001).

De acordo com Foxcroft *et al.* (1996), a compra, manutenção em quarentena e o treinamento de potenciais reprodutores para uso em programas de inseminação artificial tornar-se-á um investimento muito caro, caso a fertilidade destes machos não seja aceitável quando de sua utilização, uma vez que, até o momento, os métodos disponíveis são insuficientes para se prever a fertilidade de um varrão.

De acordo com Okere (2001) o maior obstáculo prático para a disseminação do uso da IA em países de grande extensão territorial, como o Canadá e também o Brasil, é a distância. Principalmente porque a maioria dos programas de IA usam sêmen

resfriado a 15°C em diluidores que garantem taxas de gestação aceitáveis por até, no máximo, 72 horas. Diante disto, existe a necessidade do desenvolvimento de protocolos incluindo diluidores que produzam boas taxas de gestação mesmo quando o armazenamento/transporte envolver maiores distâncias e tempos de estocagem (Okere, 2001).

Varrões geneticamente superiores das granjas núcleo podem ser usados extensivamente, através da IA, principalmente, em granjas núcleo e multiplicadoras. Em se tratando de granjas núcleo, os programas de IA têm feito o possível para interligar várias unidades visando à criação de um “super núcleo”, de forma a aumentar o ganho genético destas granjas e, assim, reduzir a distância genética entre os rebanhos núcleo e os comerciais. Além disso, o advento da IA tem mudado a estratégia de mercado das empresas de genética de suínos, que além das vendas de varrões, passaram a vender sêmen (Okere, 2001). Diante destes desafios, torna-se clara a necessidade do desenvolvimento de um protocolo de resfriamento e transporte de sêmen que garanta sua qualidade por um maior período de estocagem.

De acordo com Pickett (1995), à medida que o período de estocagem aumenta a fertilidade diminui, particularmente, quando os espermatozoides são armazenados a 20°C por mais de 12 horas e a 5°C por mais de 48 horas. Desta forma, considera-se que a temperatura ótima para a manutenção da motilidade (Varner *et al.*, 1988, 1989; Moran *et al.*, 1992) e da fertilidade (Palmer, 1984; Squires *et al.*, 1988) do semen resfriado/armazenado varia de 4°-6°C.

Polge, em 1956a, afirmou que os espermatozoides presentes na fração rica do ejaculado do varrão eram mais resistentes a condições adversas, tais como o resfriamento a 5°C e o congelamento/descongelamento, em relação

aos espermatozoides presentes no ejaculado total ou na fração restante.

Atualmente, muitos estudos têm descrito a presença de sub-populações espermáticas no ejaculado do varrão. Estas sub-populações diferem quanto à estabilidade da cromatina, morfologia, motilidade e ainda no que diz respeito à resistência da membrana (Rodriguez-Martinez *et al.*, 1987; Cremades *et al.*, 2005; Peña *et al.*, 2005; Saravia *et al.*, 2007b). Além disso, diferem ainda quanto à capacidade fertilizante *in vitro* (Xu *et al.*, 1996, 1998; Zhu *et al.*, 2000).

As proteínas do plasma seminal exercem importante papel durante a maturação das células espermáticas ao longo do seu trânsito no sistema genital do varrão. Da mesma forma, influenciam o transporte e sobrevivência de espermatozoides viáveis no trato reprodutivo da fêmea (Troedsson *et al.*, 2005). Estas proteínas têm papel benéfico e/ou deletério na fisiologia espermática e fertilidade (Centúron *et al.*, 2003; Caballero *et al.*, 2004). Assim, a viabilidade dos espermatozoides *in vitro* pode ser comprometida pela manipulação, tal como a criopreservação, altas taxas de diluição e sexagem, os quais removem os componentes do plasma seminal dos espermatozoides (Ashworth *et al.*, 1994; Garner *et al.*, 2001). Tal efeito deletério pode ser neutralizado pela adição de aproximadamente 10% de PS homólogo (Caballero *et al.*, 2004).

Os espermatozoides presentes nos primeiros 10-15 mL da fração rica em espermatozoides (FRE) ou P1 resistem melhor à manipulação, tais como ao armazenamento a temperatura ambiente, ao resfriamento ou, ainda, ao congelamento/descongelamento quando comparados aos espermatozoides presentes no restante do ejaculado ou P2 (Sélles *et al.*, 2001; Peña *et al.*, 2006; Saravia *et al.*, 2007, 2009). Obviamente, estas diferenças não podem ser atribuídas, exclusivamente,

às células espermáticas, uma vez que os espermatozoides coletados de toda a FRE, como feito normalmente, são capazes de suportar bem a manipulação, assim como os espermatozoides oriundos da P1, isoladamente. Estabeleceu-se, então, que esta diferença entre P1 e P2 deve-se às diferenças observadas no plasma seminal destas duas frações, que influenciam de forma diferente na fisiologia dos espermatozoides, fortuitamente presentes na P1, como descrito acima.

O papel preciso da maioria das proteínas do PS na fisiologia dos espermatozoides continua obscuro. No suíno, a família de proteínas seminais compreende cinco membros, AQN-1, AQN-3, AWN, PSP-1 e PSP-II, representando juntas acima de 90% das proteínas do PS do varrão. Estudos afirmam que o heterodímero PSP-1/PSP-II atua como modulador exógeno da atividade imunológica uterina (Leshin *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1998; Assrey *et al.*, 2002, 2003).

No trabalho de Garcia *et al.*, (2009), os ejaculados de três varrões foram coletados em tubos estéreis de 50 mL, de forma seriada, em frações, dependendo do momento da ejaculação, visando separar o PS de cada uma delas. A viabilidade, integridade acrossômica e motilidade foram avaliadas para estudar o efeito de seis frações do PS sobre a função espermática. Os espermatozoides expostos ao PS das frações 1 a 3 exibiram os maiores valores ($p < 0,005$) de espermatozoides viáveis com acrossoma intacto. No entanto, a fração 2 ou fração rica em espermatozoides foi a que apresentou os melhores resultados. Neste estudo, observou-se, ainda, que o heterodímero PSP-I/PSP-II esteve presente em todas as frações do PS, apesar da sua concentração aumentar na fração pós-espermática. Em contrapartida, a fração rica em espermatozoides (2) foi caracterizada pelos menores níveis de proteínas totais (15,37 mg/mL) e de PSP-I/PSP-II (1,8mg/mL). Em concordância com

trabalhos anteriores, desenvolvidos por Peña *et al.* (2003, 2006), a adição do PS da fração espermática rica alcançou os melhores resultados neste estudo. Observou-se, ainda, os efeitos deletérios dos espermatozoides altamente diluídos, oriundos da fração pós-espermática, na qual PSP-I/PSP-II alcançaram uma concentração acima de 10 mg/mL. Tal observação encontra respaldo em trabalho anterior, quando verificou-se que o heterodímero PSP-I/PSP-II exibe efeito protetor ótimo a 1,5mg/mL. Entretanto, este efeito torna-se deletério em concentrações acima de 7,5 mg/mL (Centúron *et al.*, 2005).

A porção do ejaculado tem efeito significativo na integridade da membrana plasmática dos espermatozoides, nos padrões de motilidade e também no desenvolvimento de alterações “tipo capacitação” nas células espermáticas criopreservadas. No trabalho de Peña *et al.* (2003), avaliou-se a coloração dos espermatozoides com Anexina-V visando-se a detecção de alterações primárias na integridade da membrana plasmática dos espermatozoides oriundos da P1 ou P2 do ejaculado. Diferenças significativas foram encontradas entre ambas as frações do ejaculado, tanto para o sêmen fresco quanto para o congelado. Antes do congelamento, a P1 apresentava mais células vivas não-apoptóticas. Embora espermatozoides apoptóticos tenham sido encontrados em ambas as porções, a frequência de células vivas, com lesões apoptóticas iniciais foi menor ($p < 0,001$) na P1 que na P2. O menor número de espermatozoides com princípio de apoptose, pós-congelamento, na P1, sugere que os espermatozoides do varrão presentes nesta porção do plasma seminal são menos sensíveis ao estresse induzido pela manipulação.

Peña *et al.* (2006) coletaram sêmen de forma fracionada para separar P1 e P2 de 5 varrões. O sêmen foi então congelado usando o protocolo convencional para posterior análise computadorizada da

motilidade e morfologia (CASA e ASMA), assim como submetido à coloração com Anexina-V. Foram observadas diferenças ($p < 0,001$) para todas as variáveis morfológicas, sendo que os espermatozoides contidos na P1 foram menores e mais amplos. Também foram identificadas diferenças significativas entre varrões e entre porções do ejaculado quanto à qualidade espermática pós-descongelamento. Assim, foram identificados varrões com melhores resultados de motilidade e integridade de membrana na P1, enquanto que em outros machos, os melhores resultados foram oriundos da P2. Concluiu-se, então, que a identificação da porção do ejaculado mais adequada para suportar uma boa criopreservação em cada indivíduo pode ser prontamente aplicável, visando diminuir a variação individual na congelabilidade do sêmen em varrões.

No trabalho de Saravia *et al.* (2009), os espermatozoides oriundos das duas diferentes porções do ejaculado foram submetidos ao resfriamento controlado e ao congelamento/descongelamento, sendo o envase realizado em “MiniFlatPacks” (MFPs). As avaliações de motilidade foram realizadas pelo sistema CASA. A percentagem de espermatozoides móveis totais foi maior ($p < 0,05$) na P1 (65,8%) e P2, quando esta foi incubada com o PS oriundo da P1 (62,1%). Houve também diferenças quanto à percentagem de espermatozoides com a membrana plasmática intacta pós-descongelamento, sendo maior na P1 que na P2 (63,31% x 58,52%).

A fertilização *in vitro* (FIV) em suínos tem sido estudada desde que a capacitação espermática foi descoberta em 1951. Esta técnica tem sido eficaz para a avaliação da fertilidade do varrão (Wang *et al.*, 1991; Ivanova e Mollova, 1993; Martinez *et al.*, 1993). Os resultados mais consistentes foram obtidos quando utilizou-se espermatozoides de uma fração rica em

espermatozoides padronizada. As taxas de penetração, de formação de pronúcleo masculino, de poliespermia e o número médio de espermatozoides penetrando o oócito foram todas mais altas quando utilizou-se espermatozoides oriundos da P1 da FRE para a FIV (Zhu *et al.*, 2000).

O resfriamento do sêmen a 5°C resulta em alterações da membrana espermática similares à capacitação (Vadnais e Kenneth, 2007). Entretanto, alguns componentes do plasma seminal são capazes de inibir tais alterações. Tal capacidade inibitória resulta da ligação de proteínas do PS à superfície espermática, de forma a prevenir a ocorrência das mudanças necessárias à capacitação e/ou inibir os sinais de transdução das vias capacitativas (Vadnais e Kenneth, 2007).

Segundo Benson *et al.* (1967), as proteínas do plasma seminal podem funcionar estabilizando a membrana contra a perda do colesterol e reorganização lipídica (etapas da capacitação), de forma similar à proteção conferida pelas lipoproteínas da gema de ovo.

No trabalho de Alkmin (2010), envolvendo a coleta dos primeiros 15mL da fração rica (P1) e posterior resfriamento do sêmen a 5°C, não observou-se diferenças ($p > 0,05$) entre as frações no que diz respeito à motilidade do sêmen a fresco, que apresentou valores (74,5% para ambas as frações) dentro do estabelecido como critério mínimo para o processamento de um ejaculado, que é de 60% (Flowers, 1997; Johnson *et al.*, 2000). Com relação ao vigor, a P1 apresentou um valor médio superior ($p < 0,05$) ao encontrado na P2, que neste estudo constou de todo o restante do ejaculado.

De acordo com Garner e Hafez (1996), a concentração espermática média da fração rica do ejaculado varia de 500 a 1000 x 10⁶ espermatozoides/mL, sendo no ejaculado total de 386,18 x 10⁶ espermatozoides/mL (Braga, 2007). Já Saravia *et al.* (2010)

trabalhando com os primeiros 10 mL da FRE ou P1 relataram uma concentração média de 1600×10^6 espermatozoides/mL. Segundo os mesmos autores, os espermatozoides presentes na P1 (16×10^9) representaram 23,4% do número total médio de espermatozoides da fração rica, que foi de $68,4 \times 10^9$ espermatozoides.

2.4.2.2. Fertilidade do sêmen de varrões submetidos à colheita total ou fracionada

No geral, a reprodução ocorre apenas quando uma geração produz filhos vivos, saudáveis e capazes de perpetuar a espécie. Este é um processo complexo em mamíferos. Como objetivos das estimativas de fertilidade visa-se obter, normalmente, a média e a variação, para estabelecer prováveis diferenças. O conhecimento tem se expandido rapidamente com a explosão de técnicas moleculares, genômicas e computadorizadas, embora o conhecimento sobre a fertilidade continue longe de ser completo (Foote, 2003).

Os parâmetros determinantes da fertilidade de um varrão são as taxas de gestação e o tamanho da leitegada nascida. Atualmente, na produção de suínos tem-se aceitado que a combinação do exame clínico completo do macho e de avaliações convencionais do sêmen (concentração, motilidade e morfologia) podem ser uma alternativa para os dados reais de fertilidade. Embora estas avaliações sejam capazes de identificar tanto machos sub-férteis quanto inférteis, não são refinadas o suficiente para identificar a fertilidade relativa dos varrões que alcançam os parâmetros aceitos pela indústria para qualidade espermática. Os parâmetros ditos como “indicadores do sêmen utilizável”, normalmente, usados na maioria das centrais de inseminação artificial, fornecem uma estimativa muito conservadora da fertilidade individual dos varrões. Além disso, o número

relativamente alto de espermatozoides usados nas inseminações (normalmente \geq três bilhões por dose de 100 mL) e a mistura de ejaculados oriundos de varrões com fertilidade diferentes, mascaram, provavelmente, a reduzida fertilidade de alguns machos, que poderia ser demonstrada na presença de um reduzido número de espermatozoides dos mesmos para as inseminações e/ou quando eles fossem usados individualmente (Foxcroft *et al.*, 2008).

O que se observa atualmente é que o alto custo dos experimentos *in vivo*, visando avaliar o efeito dos tratamentos seminais sobre a fertilidade das fêmeas, tem limitado sua execução (Palhares, 1997). Soma-se a isso o complicador tempo, uma vez que os trabalhos realizados a campo, envolvendo a inseminação de fêmeas e acompanhamento das taxas de gestação, de parto e das características de leitegada, demandam mais tempo para a sua execução e são muito mais onerosos.

Desta forma, muitos trabalhos têm procurado associar a manutenção das características espermáticas *in vitro*, após diferentes tratamentos, como prova de sua eficiência (Palhares, 1997). No entanto, encontrar um teste laboratorial confiável o suficiente para prever a fertilidade potencial de uma determinada amostra de sêmen ou de um determinado macho, para uso em programas de IA ainda é considerada uma utopia. Vale salientar, neste sentido, as modestas correlações encontradas entre os resultados observados *in vitro* e a fertilidade a campo (Rodriguez-Martinez, 2003).

Proteínas específicas do plasma seminal têm sido identificadas como marcadores potenciais de fertilidade do macho ou da infertilidade em humanos (Yamakawa *et al.*, 2007; Novak *et al.*, 2010). No suíno, a caracterização inicial das proteínas do plasma seminal do varrão tem começado a ser feita (Strzezek *et al.*, 2005). Entretanto,

até o presente momento, nenhuma destas proteínas tem sido associada à fertilidade *in vivo* (Novak *et al.*, 2010).

Como parte do processo de fertilização, as proteínas do plasma seminal têm um importante papel na formação do reservatório espermático, na capacitação espermática e na interação espermatozóide-oócito (Foxcroft *et al.*, 2008; Rodriguez-Martinez *et al.*, 2008). Novak *et al.* (2010) identificaram proteínas específicas do plasma seminal da FRE, tais como a PSP-I e GPX-5, que poderiam estar associadas, tanto negativamente quanto positivamente, com a fertilidade do varrão *in vivo*. As bases para o seu uso de uma maneira complementar na identificação de machos de alta ou baixa fertilidade, teria grande efeito na eficiência reprodutiva do rebanho.

De acordo com Zhu *et al.* (2000), a P1 (primeiros 10 - 15 mL da FRE) contém menos proteínas totais do que o restante do ejaculado. Uma explicação para essa diferença é a origem dos componentes do plasma seminal, no que diz respeito às diferentes glândulas sexuais acessórias e, assim, da contribuição sequencial das proteínas seminais. Desta forma, as primeiras secreções presentes no ejaculado seriam as oriundas da próstata, que servem para limpar o sistema uro-genital do macho, sendo esta secreção seguida pela P1. O ejaculado torna-se então progressivamente diluído pelo fluido advindo das vesículas seminais (próximos 30-70 mL). A secreção prostática contém baixas concentrações de PSP-I e AWN-1 (Manásková *et al.*, 2002).

Estas diferenças qualitativas e quantitativas na composição protéica da P1 e da P2 poderiam explicar, parcialmente, porque os espermatozoides da P1 são mais resistentes ao resfriamento e sobrevivem em maiores proporções, quando comparados aos espermatozoides da P2. Sabe-se que os espermatozoides do epidídimo do varrão resistem melhor aos protocolos de congelamento, quando comparados aos

espermatozoides ejaculados (Lasley e Bogart, 1944). Desta forma, o fato da P1 ainda conter relativamente grandes proporções dos componentes do fluido epididimário, pode explicar, parcialmente, o melhor desempenho dos espermatozoides contidos nesta porção (Saravia *et al.*, 2009). Além disso, a alta concentração espermática na P1 pode favorecer a retenção de uma maior proporção de proteínas em suas membranas, reduzindo desta forma a quantidade residual de proteínas totais do PS.

Neste sentido, Metz *et al.* (1990), verificaram que os espermatozoides do epidídimo adsorveram 14 pg de proteína individualmente, em um período de 10 minutos e que 82% das proteínas retidas eram de baixo peso molecular. Segundo estes autores, os espermatozoides considerados de baixa qualidade adsorveram, significativamente, menos proteínas (3 pg de proteínas/espermatozóide em 10 minutos).

Novak *et al.* (2010) coletaram o semen de forma fracionada, visando a separação da fração rica em espermatozoides, sendo a P1 coletada separadamente. A fertilidade dos varrões foi avaliada *in vivo* utilizando-se a inseminação com 1,5 bilhões de espermatozoides/ dose. Em seguida, os autores correlacionaram os dados de fertilidade com a quantidade de proteína presente no PS de cada varrão e em cada dose inseminante. Neste trabalho, estudou-se as características do sêmen dos dois machos apresentando as maiores taxas de gestação e de parto, bem como maior número de leitões nascidos. Verificou-se, nestes varrões, que a concentração de proteína total (mg/mL) foi menor, assim como a concentração de proteínas/dose inseminante, bem como a concentração de PSP-I.

Alkmin (2010) coletou os primeiros 15 mL da fração rica (P1) e o restante do ejaculado (P2) de varrões da raça landrace,

submetendo as duas frações à dois diferentes protocolos de resfriamento, a saber diluição da P1 e P2 no diluidor GGO e resfriamento a 5°C, e diluição da P1 e P2 no diluidor comercial MR-A[®], acompanhada pelo resfriamento a 17°C. As doses preparadas para as inseminações apresentavam três bilhões de espermatozoides em 100mL. Neste trabalho, o autor não observou influência ($p>0,05$) da fração do ejaculado, nem do protocolo de resfriamento sobre as taxas de gestação e as características das leitegadas. Diante disso, o autor afirmou que as duas frações do ejaculado poderiam ser utilizadas para a preparação de doses inseminantes, sem prejuízo à fertilidade das fêmeas inseminadas.

2.4.3. Tempo para a diluição do sêmen

Um dos maiores obstáculos para o uso da inseminação artificial em suínos tem sido a dificuldade para manter a motilidade e a fertilidade do sêmen do varrão após a diluição e armazenamento por prolongados períodos de tempo (Polge, 1956b).

Neste sentido, Dziuk (1958) afirma que as avaliações da motilidade após o armazenamento em vários experimentos pilotos indicaram que o sêmen a fresco ou diluído pode ser armazenado, satisfatoriamente, à temperatura ambiente por até 4 horas. No entanto, o armazenamento do sêmen a temperatura ambiente por oito horas ou mais, antes da diluição/resfriamento, reduziu a motilidade espermática subsequente.

Estudos preliminares envolvendo a diluição do sêmen indicam que a diluição antes do armazenamento, de uma parte de sêmen para uma parte de diluidor (v/v), resultou em motilidade inferior, quando comparada à uma diluição envolvendo uma parte de sêmen para duas, quatro ou oito partes de diluidor (Dziuk, 1958).

Quando da ejaculação, os espermatozoides são diluídos no fluido seminal oriundo das glândulas sexuais acessórias, sendo a motilidade mantida por algumas horas. Para prolongar sua viabilidade *in vitro*, torna-se necessário reduzir sua atividade metabólica pela adição de inibidores químicos ou da redução da temperatura de armazenamento, sendo que as duas alternativas requerem a diluição do sêmen (Jonhson *et al.*, 2000).

Além do prolongamento do tempo de vida, os espermatozoides de mamíferos respondem à diluição com um aumento inicial do metabolismo, seguido pela perda da motilidade e aumento das lesões de membrana (Jonhson *et al.*, 2000).

Em estudo envolvendo sêmen equino, Palmer (1984) 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 (% de móveis após a conservação/ % móveis fresco) 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.

Um procedimento que tem merecido considerável atenção é a pré-diluição do sêmen, quando uma pequena proporção de diluidor é adicionada ao sêmen antes do processamento completo. Muitas centrais usam a pré-diluição como rotina, visando reduzir o choque térmico e garantir a manutenção da viabilidade espermática até o final do processamento. Os fatores mais importantes para a manutenção da qualidade espermática incluem a temperatura de coleta do sêmen, a temperatura de armazenamento e finalmente a temperatura do meio diluidor. Quando os espermatozoides são resfriados abruptamente da temperatura corporal para menos de 15°C o choque térmico pode acontecer, reduzindo a viabilidade espermática. Desta forma, o sêmen deve ser diluído tão rápido quanto seja possível após

a coleta. Além disso, a pré-diluição também parece fornecer uma mudança osmótica mais gradual, devido ao uso de um menor volume de diluidor, previamente à diluição completa. Outro fator a ser considerado é que bactérias são componentes normais do ejaculado do varrão, com concentrações médias de 109 UFC's/mL. Com a pré-diluição, ocorre a rápida exposição do sêmen a antibióticos presentes nos diluidores, o que ajudaria no controle microbiológico do ejaculado (Morrow, 2005).

2.4.4. Diluidores de sêmen de suíno

No momento da ejaculação, os espermatozoides são diluídos no plasma seminal, o qual fornece a eles os nutrientes necessários para as altas demandas metabólicas durante o transporte ao longo do sistema genital feminino. No ejaculado, esta alta atividade metabólica só pode ser mantida durante um limitado período de tempo (Lewis, 1911). Desta forma, visando-se a preservação dos espermatozoides por períodos prolongados, sua atividade metabólica precisa ser reduzida através da diluição em meio apropriado aditivamente à redução da temperatura (Gadea, 2003).

Diluidores de sêmen são definidos como uma solução aquosa utilizada para aumentar o volume do ejaculado de modo a produzir o número de doses desejado. Tal procedimento precisa ser feito enquanto as características funcionais das células espermáticas estão preservadas, de modo a garantir adequada taxa de fertilidade das fêmeas que serão inseminadas (Gadea, 2003). Devido às suas características particulares, os espermatozoides do varrão são sensíveis a temperaturas inferiores a 15°C, abaixo da qual há redução da motilidade e redução da viabilidade (De Leeuw *et al.*, 1990).

A necessidade de manutenção do sêmen do varrão em temperaturas moderadas, restringe sua capacidade de armazenamento, uma vez que o metabolismo celular não é reduzido adequadamente e de forma que as suas condições microbiológicas podem não ser tão eficientemente controladas, como durante o armazenamento a 5°C (Gadea, 2003). Além disso, a diluição reduz a concentração de certos componentes do plasma seminal, como o K⁺ (Harrison *et al.*, 1978) ou as proteínas, alterando a viabilidade espermática. Estas perdas precisam ser compensadas pela adição de ingredientes à formulação dos diluidores.

Para que seja possível o desenvolvimento adequado da inseminação artificial de suínos, a preparação do diluidor, bem como a conservação e utilização do sêmen diluído devem implicar em atividades simples e viáveis para o produtor. Além disso, o tempo de conservação do sêmen deve ser suficiente para a execução das inseminações, devendo ainda o diluidor apresentar baixo custo (Paquignon, 1984; Paquignon *et al.*, 1987). O êxito da IA está também relacionado à capacidade do diluidor em conservar os espermatozoides em condições adequadas, visando garantir uma fertilidade adequada do sêmen (Johnson *et al.*, 1988; Woelders, 1992).

2.4.4.1. Componentes dos diluidores

Muitos diluidores estão disponíveis para uso comercial; no entanto, poucos trabalhos têm sido conduzidos visando compará-los quanto à manutenção de vários indicadores de qualidade espermática, como por exemplo, a manutenção da motilidade durante o armazenamento do sêmen (Estienne *et al.*, 2007).

O que se espera de um diluidor é que ele forneça os nutrientes necessários para a manutenção do metabolismo espermático

(monossacarídeos, como a glicose e a frutose), proteja as células espermáticas do choque térmico (Albumina Sérica Bovina – BSA), controle o pH do meio (bicarbonato, Tris, Hepes) e também a pressão osmótica (NaCl, KCl, citrato de sódio), além de garantir bom controle microbiológico, capaz de inibir o crescimento bacteriano (antibióticos) (Gadea, 2003).

Atualmente existem no mercado duas categorias de diluidores: os de longa duração, que prolongam a vida dos espermatozoides por cinco ou mais dias e os de curta duração, que preservam a viabilidade espermática por até três dias (Bortolozzo *et al.*, 2005a).

A escolha do diluidor deve considerar as condições específicas em que a IA ocorrerá, principalmente, o tempo necessário do processamento do sêmen à utilização das doses, ou seja, se o sêmen se destina ao uso imediato ou ao armazenamento durante alguns dias (Bortolozzo *et al.*, 2005a).

Dentre os componentes dos diluidores, destacam-se a água, os açúcares, os eletrólitos, os tampões, os quelantes, os antioxidantes, os antibióticos e, finalmente, as macromoléculas.

2.4.4.1.1. Água

A qualidade da água a ser utilizada na preparação dos diluidores de sêmen pode influenciar a viabilidade das células espermáticas e, assim, a fertilidade do sêmen diluído. No entanto, ainda existe discordância sobre qual o melhor tipo de água a ser usado nos programas de IA em suínos (Flowers, 1998). A água é componente essencial e tem grande importância na preservação do sêmen, uma vez que mais de 80% do diluidor é composto por água, podendo ser esta fonte de contaminação química, física e/ou microbiológica.

Existem três organizações que definem a qualidade da água; a *American Society for Testing and Materials* (ASTM), o *College of American Pathologists* (CAP) e o *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS), que tem publicado parâmetros específicos para avaliar a qualidade da água.

Apesar dos critérios de classificação diferirem entre as organizações, cada uma classifica a água basicamente em três tipos, com exceção da ASTM que a classifica em quatro tipos, conforme sua composição.

A água tipo I tem a maior pureza e requer, geralmente, a combinação de deionização com a destilação, filtração e osmose reversa, tendo a menor concentração de constituintes ionizados. O tipo II pode ser produzido por dupla destilação, sendo um nível abaixo do tipo I em termos de pureza, tendo sido utilizada, normalmente, em procedimentos que requerem água livre de contaminação orgânica e de pirógenos. O tipo III é comumente produzido, ou por destilação única, ou por troca de íons sem destilação ou osmose reversa sem destilação. Este é o tipo de água utilizada na maioria dos procedimentos laboratoriais, incluindo a lavagem de equipamentos (Flowers, 1998). Em relação à contaminação bacteriana, o tipo I deve ser livre e o tipo II deve apresentar, no máximo, 10 UFC's/mL. Desta forma, para a preparação do diluidor apenas os tipos I ou II deveriam ser utilizados (Marchetti, 2008).

O desejável é que a 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 dos acrossomas (Bortolozzo *et al.*, 2005a).

Tanto a água do tipo I quanto a do tipo II devem ser utilizadas no momento em que são produzidas, não podendo ser estocadas

para evitar contaminação. 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, resinas de trocas iônicas ou ao carvão ativado formando biofilmes, o que torna difícil a sua remoção, levando à contaminação da água (Silva *et al.*, 2006).

A produção de água de alta qualidade para a preparação do diluidor exige uma associação de processos. Marchetti (2008) sugere a associação da filtração, deionização, osmose reversa e esterilização por luz ultra-violeta, ou a filtração, deionização e destilação, nesta ordem. É importante ressaltar que cada processo de purificação é capaz de retirar determinada substância da água. Desta forma, ao se associar processos é necessária especial atenção à ordem de cada um, caso contrário, pode haver recontaminação da água (Goldberg, 2009).

A filtração é usada como pré-tratamento da água e aumenta a eficiência de outros processos de purificação. O filtro de celulose é usado para remover partículas suspensas e microorganismos. O filtro de carvão ativado é usado para a remoção de resíduos de desinfetantes, como cloro e hipoclorito, além de contaminantes orgânicos dissolvidos (Silva *et al.*, 2006).

A deionização é o processo pelo 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^+) por contaminantes catiônicos, como o cálcio, magnésio e sódio. As aniônicas trocam seus íons hidroxila (OH^-) pelos contaminantes aniônicos, como clorato, sulfato e nitrato. A condutividade elétrica das águas do tipo I e II deve ser no máximo de 0,06 e 1,0 $\mu S/cm$, respectivamente.

A 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, de forma a se tornar mais pura que a original. Este processo remove partículas e bactérias, mas não remove substâncias inorgânicas (Silva *et al.*, 2006).

A osmose reversa consiste na passagem forçada da água, com auxílio de uma bomba de alta pressão, por uma membrana semipermeável que irá reter as impurezas (Silva *et al.*, 2006). Há remoção de 90-95% de material inorgânico e 99% de material orgânico, mas não remove gases ionizáveis insolúveis. Quando usado como processo único, produz água tipo III (Marchetti, 2008).

O sistema ultra-violeta é capaz de esterilizar a água, mas não de remover sólidos e gases dissolvidos. Os raios devem atingir os microorganismos diretamente, desta forma, se houver partículas em suspensão na água pode haver prejuízo ao processo. O seu potencial de esterilização está diretamente relacionado à velocidade do fluxo da água, porque depende da intensidade da lâmpada, da penetração da radiação e do tempo de exposição (Marchetti, 2008).

É importante que apenas a quantidade de água a ser utilizada no dia seja produzida, uma vez que o seu armazenamento é indesejável. Caso seja necessário, o recipiente usado deve ser estéril, devendo a água ser mantida resfriada e protegida da luz solar (Laz Rozas, 1999).

2.4.4.1.2. Açúcares

Os espermatozoides são capazes de produzir a energia necessária para a manutenção do metabolismo celular e o movimento flagelar, principalmente, pela via glicolítica. Este processo ocorre nas mitocôndrias, localizadas na peça

intermediária dos espermatozoides (Gadea, 2003).

Como em outras células, as mitocôndrias espermáticas produzem ATP via respiração aeróbica. É interessante notar que existe variação entre espécies quanto à capacidade metabólica das mitocôndrias espermáticas, o que explica as variações na habilidade dos espermatozoides de diferentes espécies em metabolizar diferentes substratos (Turner, 2005).

O sêmen do varrão é de especial interesse do ponto de vista da bioquímica e da biofísica comparativa, uma vez que tanto o plasma seminal quanto os espermatozoides exibem algumas características distintas (Mann, 1964). Os espermatozoides dos mamíferos e das aves desenvolveram a capacidade de utilizar substratos extracelulares para garantir a motilidade, tanto pela via aeróbica quanto anaeróbica (Nevo *et al.*, 1970). No entanto, os espermatozoides do varrão têm baixa capacidade de frutólise quando comparados aos do touro e do carneiro, tornando-se rapidamente imóveis na ausência de oxigênio (Polge, 1956a; Aalbers *et al.*, 1961).

A fonte de energia mais comumente usada nos diluidores de sêmen suíno é a glicose, que é adicionada em concentrações muito altas (100 – 200 mM), provavelmente, visando ajudar na manutenção de uma osmolaridade adequada. Entretanto, estas altas concentrações estão muito acima das necessárias para que os espermatozoides do varrão alcancem sua atividade metabólica ótima (5-10 mM) (Medrano *et al.*, 2005). Além da glicose, outros açúcares foram testados, tais como a galactose, frutose, ribose e a trealose, que não apresentaram resultados superiores aos obtidos com o uso da glicose (Gadea, 2003).

A maioria dos diluidores comerciais tem outras substâncias que podem ser usadas pelos espermatozoides como fonte energética, sendo a mais importante o

citrato, que também é utilizado para a manutenção da osmolaridade e do pH. Entretanto, os espermatozoides do varrão podem utilizá-lo como fonte energética via ciclo de Krebs (Medrano *et al.*, 2005).

Embora os substratos metabólicos usados para a geração de ATP pelos espermatozoides variem entre espécies, os espermatozoides do varrão dependem de certos substratos glicosiláveis, do lactato, e ainda que de forma limitada, de ácidos graxos de cadeia curta, como o acetato e o propionato (Jones e Chantrill, 1989). Desta forma, são quase que totalmente dependentes da via glicolítica, não para a produção direta de ATP pela fosforilação de substratos, mas para a produção de lactato como fonte primária de acetilCoa para as mitocôndrias espermáticas (Jones, 1997).

De acordo com Jones e Chantrill (1989) os espermatozoides do varrão incubados na presença de vários substratos *in vitro* só são capazes de oxidar a glicose, frutose, glicerol, glicerol-3-fosfato, lactato e os ácidos graxos de cadeia curta, embora a energia gerada a partir destes substratos seja menor do que a gerada a partir da glicose (Medrano *et al.*, 2005).

Os espermatozoides do varrão têm um complexo sistema para otimizar seus níveis de energia, através de um sofisticado controle do seu fluxo de energia. Desta forma, as células provenientes do sêmen fresco mostram grande predominância de consumo de monossacarídeos pela via glicolítica, com menos de 1% da energia gerada nestas condições vindas da glicose oriunda do ciclo de Krebs (Marín *et al.*, 2003). Entretanto, estas células mostram diferenças marcantes na sua habilidade de consumir um açúcar específico. A glicose é o monossacarídeo mais rapidamente consumido, através da glicólise, quando se compara à utilização da frutose, sorbitol e à manose. Estas diferenças são relacionadas à capacidade dos espermatozoides de

fosforilar estes açúcares (Medrano *et al.*, 2005).

Os espermatozoides dos suínos são também capazes de utilizar substâncias que não são hexoses como substratos energéticos, tais como o lactato (Jones, 1997), o glicerol (Jones *et al.*, 1992) e o citrato (Calvin e Tubbs, 1978), que podem ser usados para gerar energia via ciclo de Krebs (Medrano *et al.*, 2005).

Observa-se, nos espermatozoides do varrão, a conversão do ciclo de Krebs em uma via metabólica “marginal” na presença de hexoses. Por outro lado, existe uma via principal, na presença de substratos que não sejam hexoses (lactato, glicerol, citrato). Isto levanta uma questão sobre como os espermatozoides do varrão controlam a atividade do ciclo de Krebs e da via glicolítica (Medrano *et al.*, 2005).

Do ponto de vista prático, o complexo controle do metabolismo energético dos espermatozoides do varrão provoca uma discussão sobre a influência que a concentração e o tipo específico de substrato energético tem na habilidade de sobrevivência espermática em diluidores para refrigeração (Medrano *et al.*, 2005).

2.4.4.1.3. Eletrólitos

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

A força iônica de um diluidor parece não ser de importância primária nos diluidores de sêmen suíno, onde a osmolaridade é mantida por componentes não iônicos, tais como a glicose. Isto pode explicar a importância das proteínas ligadas à superfície das membranas espermáticas,

que são prontamente solubilizadas em meios com alta força iônica (Watson, 1995).

Os íons presentes em meios diluidores são normalmente o bicarbonato de sódio e/ou o citrato de sódio, sendo o último em menores concentrações (mínimo 4 mM K^+) para manter o funcionamento da bomba de Na^+ e K^+ das células e prevenir a exaustão do potássio intracelular, com consequente perda da motilidade (Alvarez e Storey, 1982). O bicarbonato, em contrapartida, é conhecido por causar mudanças na arquitetura da membrana lipídica, após alguns minutos de exposição, o que inicia a desestabilização da membrana, sendo um passo inicial para a capacitação espermática (Harrison *et al.*, 1996).

Os espermatozoides do varrão toleram, relativamente, altas variações na osmolaridade, entre 240 a 380 mosM, embora pareça que os diluidores isotônicos ou levemente hipertônicos sejam melhores para a preservação da capacidade fertilizante do que os diluidores hipertônicos (Weitze, 1990a). A osmolaridade de uma solução isotônica é similar à do plasma sanguíneo de, aproximadamente, 300 mOsm Kg^{-1} . A maioria dos diluidores utilizados para o resfriamento do sêmen, como por exemplo, o Beltsville Thawing Solution (BTS) são isotônicos (Schilling e Vengust, 1986). Um exemplo de diluidor comercial hipertônico é o Androhep.

2.4.4.1.4. Macromoléculas

2.4.4.1.4.1. Gema de ovo

Polge, em 1956 afirmou que um dos maiores obstáculos para a disseminação do uso da inseminação artificial em suínos envolvia a dificuldade para a manutenção

da motilidade e fertilidade do sêmen do varrão após a diluição e o armazenamento.

Apesar da constante evolução das biotecnologias da reprodução animal, ainda não se estabeleceu nas rotinas das centrais o uso de um protocolo de resfriamento do sêmen a temperaturas inferiores a 15°C, que viabilizaria o armazenamento e transporte do sêmen por períodos mais longos de tempo. Isto se deve, principalmente, à insistência no uso de diluidores comerciais, que apesar de fornecerem boas taxas de fertilidade com o resfriamento até 15°C, não são os mais indicados para o resfriamento do sêmen do varrão a temperaturas inferiores.

A descoberta dos efeitos benéficos da gema de ovo sobre a fertilidade do sêmen diluído por Phillips, em 1939, liderou seu uso nos diluidores para bovinos. Em 1942, Lasley *et al.* observaram a capacidade da gema em proteger os espermatozoides contra o choque térmico. Em 1949, a descoberta de que o sêmen bovino poderia ser congelado com o glicerol por Polge *et al.* direcionou as pesquisas sobre as qualidades protetoras da gema de ovo.

Diferentes pesquisadores, dentre eles Roy (1955), Du Mesnil du Buisson (1956), Du Mesnil du Buisson e Dauzier (1956), Polge (1956a) e Dziuk (1958) já afirmavam que os diluidores que melhor preservavam a motilidade do sêmen pareciam ser aqueles contendo glicose ou glicina associadas à gema de ovo ou leite.

Durante os últimos 60 anos, os crioprotetores utilizados nos diluidores de sêmen têm sido continuamente revisados, embora os ingredientes básicos destes diluidores continuem os mesmos. A gema de ovo, o leite e o glicerol são indispensáveis em praticamente todos os diluidores usados para a preservação do sêmen resfriado ou congelado (Bergeron e Manjunath, 2006).

A gema de ovo, sendo um produto de origem animal, representa um risco em potencial de contaminação do sêmen, além de não haver uniformidade na sua composição. Consequentemente, há crescente interesse no desenvolvimento de novos diluidores livres de produtos de origem animal. No entanto, é difícil encontrar substitutos para a gema de ovo porque os mecanismos envolvidos na proteção espermática conferida contra os danos causados pela estocagem, resfriamento e/ou congelamento continuam obscuros (Bergeron e Manjunath, 2006).

Normalmente, a gema de ovo é usada na concentração de 20% (v/v) no diluidor, existindo evidências de que os constituintes responsáveis pela ação protetora da gema de ovo são as lipoproteínas de baixa densidade (LDL's) (Pace e Graham, 1974; Watson, 1976; Foulkes, 1977; Amirat *et al.*, 2004). No entanto, os mecanismos pelos quais esta proteção é realizada continuam elusivos. Existem três hipóteses sobre a possível ação das LDL sobre os espermatozoides. A primeira sugere que as LDL se associam com a membrana espermática, de forma a fornecerem proteção às células espermáticas através da estabilização da membrana (Watson, 1975; Foulkes, 1977; MacDonald e Foulkes, 1981). De acordo com a segunda hipótese, os fosfolípidos presentes na LDL protegem os espermatozoides pela formação de um filme protetor na superfície espermática (Quinn *et al.*, 1980) ou pela reposição dos fosfolípidos da membrana celular espermática que são perdidos ou danificados durante o processo de resfriamento ou congelamento (Foulkes *et al.*, 1980; Graham e Foote, 1987). Finalmente, de acordo com a terceira hipótese, as LDL competem com peptídeos catiônicos (<5 KDa) deletérios, presentes no plasma seminal, pela ligação na membrana espermática, conferindo, desta forma, proteção à mesma (Vishwanath *et al.*, 1992).

Uma quarta teoria foi recentemente proposta por Bergeron e Manjunath (2006). De acordo com os autores, as proteínas ligadoras de lipídeos, presentes no plasma seminal de touros, as denominadas proteínas BSP's (Bovine Seminal Plasma Proteins) têm capacidade de se ligar ao grupo colina dos fosfolípides das LDL's, formando com estas um complexo estável. A sua capacidade de ligação é muito alta, com uma molécula de LDL podendo ligar 240-555 moléculas de BSP's.

Baseando-se nestes achados, os autores propuseram que no momento da ejaculação as BSP's secretadas pelas vesículas seminais do touro são liberadas junto aos espermatozoides (Manjunath *et al.*, 1994). As BSP's se ligam então à membrana espermática e induzem a saída de colesterol e fosfolípides (Thérien *et al.*, 1998, 1999). É importante ressaltar que este efluxo de colesterol e fosfolípides, estimulado pelas BSP's, é tempo e concentração dependente (Manjunath e Thérien, 2002). Desta forma, quando o sêmen não é diluído, os espermatozoides são continuamente expostos a altas concentrações de BSP's e a uma remoção lipídica contínua, que resulta em menor resistência ao choque térmico, bem como ao resfriamento e/ou congelamento. No entanto, quando os ejaculados são diluídos com diluidores contendo gema de ovo, minutos após a coleta, as LDL sequestram a maior parte das BSP's presentes no sêmen, de forma a garantir alterações mínimas na membrana espermática (Bergeron e Manjunath, 2006). Além disso, é sabido que espermatozoides contendo baixas concentrações de colesterol em sua membrana plasmática, apresentam menor resistência ao choque térmico.

No sêmen diluído com gema de ovo ou LDL, aproximadamente 80% menos BSP's se associam aos espermatozoides; conseqüentemente, o efluxo de colesterol e fosfolípides é menor (Bergeron *et al.*, 2004). Desta forma, as funções espermáticas tais como motilidade,

integridade acrossômica e a viabilidade são protegidas. As BSP's participam do processo de capacitação espermática, pela retirada de colesterol e fosfolípides da membrana espermática, bem como da ligação das células espermáticas às células do oviduto (Manjunath e Thérien, 2002). Desta forma, a redução das BSP's ligadas aos espermatozoides, na presença da gema de ovo, pode ser uma das razões pelas quais o sêmen criopreservado ou resfriado tem menor fertilidade que o sêmen fresco (Bergeron e Manjunath, 2006), considerando-se que a capacitação é fundamental para a fertilização do ovócito.

As BSP's possuem homólogos aparentemente ubíquos distribuídos entre os mamíferos, embora sua concentração possa variar no plasma seminal das diferentes espécies. Desta forma, este mecanismo de ação acima proposto pode também ser uma realidade para outras espécies que não a bovina (Bergeron e Manjunath, 2006).

O componente protéico da gema de ovo é composto principalmente por 68% de lipoproteínas de baixa densidade, 16% de lipoproteínas de alta densidade, 10% de livetinas e 4% de fosvitinas, localizadas em duas frações facilmente separáveis da gema, os grânulos e o plasma (Sirvente *et al.*, 2007). O plasma corresponde a 78% da matéria seca da gema, enquanto os grânulos representam 22%. Considerando-se os componentes químicos, a matéria seca da gema contém 33% de proteínas, 63% de lípides, que são por sua vez divididos em triglicerídeos (43%), colesterol (2,6%) e fosfolípides (18%). Os fosfolípides, por sua vez, são compostos de 16% de fosfatidilcolina e de 2% de fosfatidiletalonamida (Anton e Gandemer, 1997). Os grânulos são estruturas microscópicas, irregulares e insolúveis na gema. São constituídos de 70% de lipovitelininas, que correspondem às lipoproteínas de alta densidade (High density lipoproteins – HDL), 16% de fosvitinas e 12% de lipoproteínas de baixa

densidade (LDL). As LDL's são compostas por cerca de 11-17% de proteína e 89% de lipídeos, sendo os últimos divididos em triacilglicerol (69%), fosfolípides (27%), colesterol e ésteres de colesterol (4%) (Anton e Gandemer, 1997).

As LDL's apresentam-se como uma microemulsão biológica com importantes partículas envolvidas no transporte e no metabolismo de colesterol. São formadas por uma estrutura esférica de 17-60 nanômetros de diâmetro, apresentando um centro composto de triglicerídeos e ésteres de colesterol, circundado por fosfolípides e apoproteínas. Como seus grupos hidrofílicos estão orientados para a superfície e os hidrofóbicos voltados para o interior, as LDL's se mostram muito solúveis em água, apresentando densidade de 0,982g/mL (Evans *et al.*, 1968). Além disso, possuem alta solubilidade e boa estabilidade, não demonstrando alteração estrutural em temperaturas extremas (-80°C a 75°C) (Anton *et al.*, 2003).

Os diluidores utilizados para congelar o sêmen do varrão são baseados na gema de ovo e glicerol como agentes crioprotetores, incluindo, ainda, alta concentração de açúcares e um detergente, a trietanolamina lauril sulfato (Orvus es paste – OEP, vendido como Equex STM, Nova Chemical Sales Inc., Scituate, MA, USA). O diluidor mais comumente usado é o lactose-gema de ovo (Westendorf *et al.*, 1975) além do diluidor denominado BF-5 descrito por Pursel e Johnson (1975), cuja composição inclui a glicose, a gema de ovo e o Tris como tampão.

Graham *et al.* (1971) observaram que a adição do surfactante OEP aos diluidores de sêmen apresentando gema de ovo em sua formulação reduziu os danos do congelamento nos espermatozoides do varrão. A hipótese atual, ainda que não comprovada, é que as propriedades anfipáticas do OEP permitem a emulsificação e dispersão dos lipídeos da

gema de ovo, tornando-os mais disponíveis à membrana plasmática espermática. Vale salientar, neste sentido, que Pursel *et al.* (1978) verificaram que o sêmen suíno, incubado durante uma hora com 0,1% de OEP, em diluidor sem gema de ovo, apresentou grande efeito lesivo sobre o acrossoma e a motilidade espermática. Por outro lado, Yi *et al.* (2002) observaram que a utilização de um diluidor apresentando uma concentração final de 0,5% de OEP e 20% de gema de ovo, resultou em um aumento significativo do número de espermatozoides com crista apical normal e móveis, após o congelamento/descongelamento do sêmen.

Watson (1981) estudando o papel das LDL's sobre os espermatozoides do carneiro resfriados a 5°C verificou uma forte ligação entre a membrana plasmática dos espermatozoides com as LDL's, a partir dos seus componentes protéicos. Além disso, Cookson *et al.* (1984) afirmaram que nos bovinos esta ligação é muito forte, resistindo a mais de dez processos de lavagem. De acordo com estes autores, a remoção do conteúdo lipídico das lipoproteínas implicaria na redução de sua capacidade ligante com as membranas plasmáticas.

Footo (2002) utilizou o sêmen diluído em diluidor à base de gema de ovo, resfriado a 5°C e preservado por 48 horas para inseminar 70 leitoas e 55 porcas, e obteve uma média de 10,8 leitões nascidos. A taxa de parto foi de 63%, sendo que as porcas pariram 1,7 leitões a mais por leitegada que as leitoas. Neste estudo, o sêmen foi diluído em diluidor contendo 20% de gema de ovo, 0,33% de citrato de sódio, 0,33% de glicina, 1% de glicose, 1000 UI de penicilina e 1000 µg de estreptomicina/mL. A diluição foi feita a uma temperatura de 20-25°C, sendo o sêmen diluído e resfriado por 4 horas até 5°C. Apesar da rápida taxa de resfriamento, a motilidade do sêmen não declinou mais do que 10% durante as 48 horas de armazenamento.

Jiang *et al.* (2007) avaliaram a qualidade dos espermatozoides suínos congelados em um diluidor Tris-glicose contendo concentrações de 6-10% (p/v) de lipoproteína. Observaram, neste estudo, que a concentração de 9% foi capaz de preservar a motilidade espermática, a integridade da membrana e do DNA. Sugeriram, ainda, que a determinação da concentração ótima de lipoproteína a ser usada, bem como o seu mecanismo de ação precisam de mais estudos.

Ao compararem as características físicas do sêmen e a fertilidade de fêmeas suínas inseminadas, Braga *et al.* (2009) utilizaram o sêmen diluído em BTS[®] e armazenado em geladeira a 17°C como grupo controle com o sêmen diluído no diluidor glicina-gema de ovo (GGO), proposto por Foote (2002), e armazenado a 5°C, em contêiner especial proposto por Roner *et al.* (2006). No que se refere à manutenção das características físicas seminais (motilidade e vigor), o sêmen diluído em GGO foi superior ($p < 0,05$) ao sêmen diluído em BTS[®] a 17°C, após 19,79 horas de armazenamento a 5°C. Além disso, obtiveram uma taxa de gestação de 97,14% para as fêmeas inseminadas com o sêmen diluído em BTS[®] (17°C) e estocado por 18,39 horas e de 77,14% para o sêmen diluído em GGO (5°C). Entretanto, não observaram diferenças estatísticas quanto ao número de leitões nascidos totais (14,87 vs 10,72) e vivos (13,26 vs 10,12), respectivamente, para o BTS[®] e para o GGO.

Nesta mesma linha de pesquisa, Alkmin (2010) utilizou o diluidor GGO, proposto por Foote (2002), para diluir os primeiros 15 mL de sêmen da fração rica em espermatozoides do ejaculado de varrões (P1). Neste estudo, o autor não encontrou diferenças estatísticas quanto às taxas de gestação quando comparou os resultados de fertilidade da P1 com os obtidos quando utilizou-se o restante do ejaculado (P2) diluído em MR-A[®] e armazenado a 17°C. No entanto, os espermatozoides diluídos em

GGO e resfriados a 5°C (P1), apresentaram um maior percentual ($p < 0,05$) de lesões acrossômicas, quando comparados aos espermatozoides diluídos em MR-A[®] e resfriados a 17°C. Além disso, o sêmen diluído em MR-A[®] resultou em um maior número de nascidos vivos.

2.4.4.1.4.2. Albumina Sérica Bovina

A albumina sérica bovina (BSA – Bovine serum albumin) foi adicionada, pela primeira vez aos diluidores de sêmen suíno, em 1980, na Itália. A sua adição visava prolongar a manutenção da motilidade e, conseqüentemente, da longevidade dos espermatozoides armazenados. Trata-se de uma proteína plasmática obtida do sangue bovino, composta por mais de 580 aminoácidos, formando uma macromolécula tridimensional (Weitze, 1990b).

O envelhecimento das células espermáticas, no transcorrer do armazenamento, pode ser atribuído a transtornos oxidativos da formação inadequada de espécies de oxigênio reativas (ROS) e/ou da subsequente peroxidação de lipídeos da membrana espermática. As mitocôndrias são o sítio principal da formação de ROS intracelular, resultando numa interrupção no transporte de elétrons, que afeta conseqüentemente a produção de ATP mitocondrial e a motilidade espermática. Visando diminuir os efeitos do envelhecimento *in vitro*, os diluidores utilizados para um armazenamento mais prolongado, os denominados diluidores de longa duração, contêm além dos anti-oxidantes, substâncias que podem reduzir o choque térmico quando o sêmen é refrigerado para temperaturas entre 10-15°C.

Os espermatozoides reagem à diluição mostrando, inicialmente, um aumento da atividade metabólica. Em seguida,

apresentam uma queda da motilidade e aumento de danos na membrana. No caso de diluições excessivas, há perda considerável da viabilidade celular. Apesar de não existirem explicações detalhadas para o chamado “efeito diluição”, parece que surgem danos celulares, em consequência das perdas de componentes intracelulares e/ou devido à eliminação de substâncias extracelulares protetoras, presentes no plasma seminal. Resultados experimentais indicam que a eliminação do plasma seminal, devido a diluição progressiva, pode ser compensada parcialmente pela adição de BSA (Johnson *et al.*, 2000).

Bredderman e Foote (1971) demonstraram que a BSA pode promover a sobrevivência espermática do touro após a diluição. Tal ação protetora fornecida pelos componentes de alto peso molecular, especialmente a BSA, nos diluidores também tem sido observada por outros autores (Cheng *et al.*, 1949; Blackshaw, 1953; White, 1953; Lindholmer, 1974a), os quais consideram ser esta ação exercida via reposição ou manutenção das lipoproteínas da célula espermática, cuja degeneração é o presságio da morte celular.

Harrison *et al.* (1978) afirmaram que o mecanismo de ação da BSA envolve, aparentemente, uma propriedade específica desta proteína. Entretanto, os ácidos graxos associados ou o grupo sulfidrila livre das proteínas não estão, aparentemente associados. Uma ação quelante também foi desconsiderada, apesar de Lindholmer (1974b) e Johnsen e Eliasson (1976) terem sugerido ser a ação da albumina, sobre os espermatozoides humanos, exercida através da sua atividade quelante do zinco.

De acordo com Weitze (1990a), 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, no entanto,

alterar o metabolismo energético espermático, uma vez que não houve qualquer alteração nas concentrações de ATP. Além disso, a BSA está ligada à remoção de produtos lipídicos danificados da membrana, modificando a sua permeabilidade e, reduzindo, também, a ação da peroxidase lipídica. A BSA, quando comparada com outras macromoléculas, como a Polivinilpirrolidona (PVP) e a β – lactoglobulina foi mais efetiva, pois seu efeito independe da concentração de íons como Ca^{2+} , HCO_3^- ou PO_4^{3-} .

A BSA melhorou a motilidade e a integridade acrossômica de espermatozoides suínos conservados por longos períodos a 15°C (Waberski *et al.*, 1989).

Por seus efeitos protetores, a BSA é normalmente encontrada na composição de diluidores comerciais de longa duração, tais como o MR-A[®], o Zorlesco[®], o Modena[®] e o Androhep[®].

2.4.4.1.5. Tampões

O pH do sêmen recém ejaculado é de aproximadamente $7,4 \pm 0,2$; similar ao de outros fluidos corporais. O pH da fração rica varia de 6,8 a 7,4 e o da fração pós-espermática de 7,0 a 7,6 (Hancock e Howell, 1959).

O pH epididimário médio é de 6,10, podendo oscilar entre 5,57 e 6,9. Devido ao meio ácido, os espermatozoides permanecem em anabiose, além de estarem imóveis.

De acordo com King e Macpherson (2005), o pH das principais frações do sêmen do varrão é de $7,69 \pm 0,33$. Estudos feitos por Paulenz *et al.* (2000), demonstraram que o pH do sêmen, logo após a coleta é de 7,21; havendo uma redução significativa para 6,69 e 7,06 após o seu armazenamento, por 96 horas a 25°C ou 20°C, respectivamente.

O pH aumenta para 7,25 se os espermatozoides forem mantidos a 15°C e para 7,29, quando a temperatura de armazenamento for de 10°C.

Quando há redução do pH seminal, tanto o metabolismo quanto a motilidade espermática são reduzidos. O metabolismo glicolítico, no qual a glicose é o principal carboidrato, leva a uma redução do pH intracelular e, conseqüentemente, à supressão do metabolismo celular. O ácido láctico é o principal metabólico deste processo e tem sido usado como indicador da qualidade seminal (Rigau *et al.*, 1996).

A adição de agentes tamponantes aos diluidores é necessária para o controle do pH. Os tampões mais simples utilizados são o bicarbonato de sódio e o citrato de sódio, os quais demonstram limitada capacidade tamponante. Estes sais são comumente introduzidos em baixas concentrações (mínimo de 4 mM) e usados como tampões para manter a bomba de sódio e potássio da célula, prevenindo a exaustão de potássio e, conseqüentemente, a perda de motilidade (Johnson *et al.*, 2000).

Outros tampões mais complexos, chamados anfóteros, como o Tes, Hepes, MOPS e o Tris, têm sido utilizados. O Tris pode controlar o pH dentro de uma amplitude maior de variação que os demais tampões (7 a 9), embora seja temperatura dependente. O MOPS e HEPES independem da temperatura e atuam em pH 6,5 a 7,9 e 6,8 a 8,2, respectivamente (Gadea, 2003). Normalmente, os tampões anfóteros são usados em diluidores de longa duração, como o MR-A[®] e o Androhep[®] (Levis, 2000).

O pH dos diluidores utilizados normalmente varia de 6,8 a 7,2, embora deva ser levado em consideração que o pH não se torna estável até 60-90 minutos a partir do momento da sua diluição em água. Além disso, os diferentes diluidores tem um padrão diferente de mudança de pH durante o tempo (Newth e Lewis, 1999).

2.4.4.1.6. Quelantes

A inclusão do ácido etileno diamino tetracético ou EDTA à composição dos diluidores comerciais foi um importante avanço para o uso do sêmen suíno resfriado e armazenado para a inseminação artificial. Esta inclusão foi primeiramente feita por Plisko, em 1965, no diluidor Kiev[®] (Johnson *et al.*, 2000).

O EDTA é uma substância quelante que captura os íons metálicos divalentes, especialmente o Ca⁺⁺, sendo creditado ao mesmo, a ação limitadora da movimentação deste íon através da membrana plasmática espermática (Watson, 1990). Tal ação previne o início da capacitação e da reação acrossômica, além de ajudar na prevenção da peroxidação lipídica, prolongando, desta forma, a viabilidade espermática durante o armazenamento (Johnson *et al.*, 2000; Silva, 2006).

2.4.4.1.7. Antioxidantes

A membrana plasmática dos espermatozoides apresenta uma composição mista de fosfolípides que pode diferir de espécie para espécie, além da temperatura de fase de transição ser variável para cada tipo de fosfolípide (Buhr *et al.*, 1994). Um componente importante que participa da integridade da membrana plasmática é o colesterol. Assim, a relação colesterol:fosfolípide da membrana plasmática do espermatozóide suíno é mais baixa (0,12) do que a dos espermatozoides bovinos (0,38) e ovinos (0,36), podendo ser este um dos fatores responsáveis pela sua maior sensibilidade ao resfriamento (DeLeeuw *et al.*, 1990).

O termo espécies de oxigênio reativas (ROS – Reactive oxygen species) é usado para descrever componentes instáveis, com curta

meia vida e que quando presentes, intracelularmente, podem afetar adversamente os processos celulares. Os ROS são produtos do metabolismo aeróbico e fazem parte da oxidação respiratória na membrana mitocondrial interna. Durante este processo, prótons podem escapar e serem usados na formação dos ROS.

Os substratos para a produção dos ROS estão presentes em toda a estrutura celular, ou seja, nas proteínas e lipídeos da membrana plasmática até no DNA nuclear (Silva, 2006). Os principais ROS produzidos são: superóxido (O_2^-); hidroperoxila (HO_2^-); hidroxila (OH^-) (Silva, 2006). Os ROS são geralmente citotóxicos, inativando muitas proteínas via oxidação de grupos sulfidrila, causando danos ao DNA e iniciando a peroxidação dos lipídeos insaturados das membranas (Christova *et al.*, 2004).

Os espermatozoides dos mamíferos são especialmente susceptíveis aos danos causados pelos ROS, devido ao seu alto conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados (Jones e Mann, 1976; Jones *et al.*, 1979; Alvarez e Storey, 1982; 1984; Aitken e Clarkson, 1987).

Sabe-se que os lipídeos da membrana plasmática, os da membrana acrossômica e as gotas citoplasmáticas são os principais alvos dos ROS (Christova *et al.*, 2004).

Durante o trânsito epididimário da maturação espermática, a composição dos fosfolípidos da membrana plasmática sofre alterações. Ocorre redução dos teores de fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol e colesterol nos espermatozoides suínos. Entretanto, os teores de esfingomielina, fosfatidilcolina, polifosfoinositois e desmoterol aumentam. O conteúdo fosfolipídico relativo é maior (70% dos lipídeos totais) na cabeça e na cauda do epidídimo do que no corpo, embora exista uma tendência geral de aumento das concentrações de dois ácidos graxos poliinsaturados específicos, o ácido

docoecosapentaenóico (22:5) e o ácido docoexanóico (22:6, DHA). Além disso, observou-se uma redução concomitante do ácido oléico (18:1) e do araquidônico (20:4). Estudos demonstraram que o DHA é cinco vezes mais susceptível à peroxidação lipídica *in vitro* do que o ácido linoléico (18:2) (Silva, 2006). Além disso, os danos oxidativos podem ser exacerbados pela fraca capacidade antioxidante do plasma seminal do varrão (Martín-Hidalgo *et al.*, 2011).

Durante o processamento espermático, tanto o resfriamento quanto o congelamento causam danos às células espermáticas. Os espermatozoides devem ser diluídos em meio nutritivo que permita a sobrevivência sob reduzida atividade metabólica, além de evitar a capacitação espermática precoce, bem como a morte celular. Os espermatozoides deteriorados irão contribuir para a produção de ROS, pela liberação de ácidos graxos poli-insaturados ao meio diluidor. Estes constituem uma boa fonte para o início das reações em cadeia da peroxidação. Além disso, os ROS produzidos pelas mitocôndrias podem lesar o DNA espermático, se uma fraca cadeia de antioxidantes não for capaz de equilibrar a sua produção. De fato, a adição de antioxidantes aos diluidores pode minimizar estes problemas, de forma que estes são rotineiramente adicionados aos diluidores de sêmen (Silva, 2006).

Os antioxidantes mais comumente utilizados nos diluidores são a vitamina E, a glutatona, e ainda algumas enzimas, como a catalase e a superóxido dismutase. A glutatona tem demonstrado ser muito efetiva na proteção da perda de motilidade, devido aos ROS, em espermatozoides de touros (Silva, 2006). Além desses, a crocina, Trolox, vitamina C, N-acetil cisteína, taurina, rafinose, trealose, cisteamina e o butilato de hidroxitolueno (BHT) também são descritos como tendo efeito positivo em diluidores de sêmen (Martín-Hidalgo *et al.*, 2011).

A gema de ovo fornece proteção e estabilização da membrana plasmática dos espermatozoides através das LDL's, o que garante menos danos espermáticos e menos espermatozoides mortos. Como descrito acima, estas ocorrências são capazes de iniciar o processo de peroxidação lipídica. Além disso, a gema de ovo é rica em vitamina E, contribuindo para o poder antioxidante do diluidor (Silva, 2006).

A melatonina é considerada desde 1993 como uma substância varredora de radicais livres, tendo sido demonstrada a sua capacidade de detoxificação de radicais hidroxila altamente reativos. Desde então, muitas publicações tem confirmado a sua habilidade em reduzir o estresse oxidativo *in vitro*. No entanto, a maioria destes estudos tem testado a capacidade antioxidante da melatonina pela imposição de tratamentos que elevam marcadamente o estresse oxidativo ou após a incubação por várias horas a 37°C. Ela não foi testada durante o armazenamento do sêmen por longos períodos. No entanto, Martín-Hidalgo *et al.* (2011) observaram um efeito negativo da melatonina sobre os espermatozoides do varrão, caracterizado por um aumento da percentagem de espermatozoides estáticos após 7 dias de armazenamento. Nas amostras com melatonina, a percentagem de espermatozoides móveis diminuiu para aproximadamente 19%, no dia 7 de estocagem.

O butilato de hidroxitolueno (BHT) é um antioxidante de baixa solubilidade em soluções aquosas (Levis, 2000); sendo a sua eficiência influenciada tanto pelo tamanho da cadeia como pelo número de anéis. O comprimento da cadeia afeta sua habilidade de interagir com a membrana plasmática do espermatozóide, que é mais rápida quando se utiliza derivados de etil ou butil (Graham e Hammerstedt, 1992). O BHT parece ter um efeito negativo sobre a motilidade, que, no entanto é controlado quando se utiliza um diluidor a base de gema de ovo

(Graham e Hammerstedt, 1992). A adição de BHT (0,025 até 0,1 mmol/litro de diluidor) ao diluidor BTS aumentou, significativamente, a motilidade espermática, bem como o percentual de acrossomas normais, no sêmen preservado a 5°C, por 5 a 6 dias. Entretanto, quando foi adicionado à diluidores específicos para o congelamento, tais como o BF-5 com 20% de gema de ovo e com lauril sulfato de sódio (Orvus es Paste), não houve influência do mesmo sobre a motilidade e integridade acrossômica (Bamba e Cran, 1992).

O BHT age na membrana plasmática aumentando a sua fluidez e tornando as células espermáticas do touro (Graham e Hammerstedt, 1992) e do varrão (Bamba e Cran, 1992), menos susceptíveis ao choque térmico. Além disso, o BHT foi efetivo quando procedeu-se ao resfriamento lento do sêmen do varrão para 5°C (Johnson *et al.*, 2000).

2.4.4.1.8. Antibióticos

O processo de coleta do sêmen no varrão está longe de ser um procedimento estéril. Desta forma, ejaculados suínos, mesmo que recentemente coletados, tem contaminação bacteriana. Os efeitos negativos da bacteriospermia parecem ser concentração dependentes, afetando a qualidade e longevidade espermáticas *in vitro*, pré e pós diluição. Devido à natureza concentração dependente desta interação, tempo e ambiente são também componentes críticos na influência negativa que as bactérias podem exercer sobre os espermatozoides (Althouse e Lu, 2005).

Tendo em vista que a contaminação bacteriana é essencialmente inevitável quando se coleta o sêmen de um varrão, os antibióticos têm sido considerados constituintes essenciais na composição dos diluidores de sêmen que os envolve. Assim,

as primeiras fórmulas dos diluidores de sêmen tinham poucas opções de antibióticos disponíveis, sendo que a maioria apresentava uma combinação de penicilina com estreptomicina. Atualmente, antibióticos mais efetivos de amplo espectro estão disponíveis, com os aminoglicosídeos sendo a classe mais popular de antibióticos usados nos diluidores comerciais, incluindo a gentamicina, neomicina e kanamicina (Gadea, 2003; Althouse e Lu, 2005).

Martín-Rillo *et al.* (1994) levantaram a hipótese de que um dos fatores que poderiam aumentar o período de conservação do sêmen do varrão, armazenado a 15°C, seria a adição aos diluidores, não apenas de determinados antibióticos, mas sim de uma associação dos mesmos, capaz de potencializar a ação antibacteriana. De acordo com autores da Espanha, a associação de kanamicina ou gentamicina como um dos membros, demonstrou máximo efeito no controle de diferentes gêneros de bactérias do sêmen de varrões.

A maioria das bactérias contaminantes do sêmen é gram-negativa, com grande percentagem se originando da família Enterobacteriaceae (Althouse *et al.*, 2000; Althouse e Lu, 2005). No entanto, mais de 13 gêneros de bactérias foram isolados do sêmen suíno contaminado, tanto do tipo entérico (*Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*) quanto não entérico (*Burkholderia cepacia*, *Alcaligenes xylosoxidans*, *Stenotrophomonas [Xanthomonas] maltophilia*) (Althouse *et al.*, 2000). Demonstrou-se, em um estudo, que estas seis bactérias responderam por 71% de todas as amostras de sêmen contaminadas, sendo que todas as bactérias contaminantes demonstraram resistência à gentamicina, ou seja, ao antibiótico mais comumente utilizado nos diluidores comerciais de sêmen suíno. Alguns gêneros de bactérias contaminantes produzem um ambiente acidificado; embora cepas de dois

gêneros (*E. coli*; *S. maltophilia*) tenham exibido atividade espermicida na ausência de ambiente ácido (Althouse *et al.*, 2000).

Pode-se afirmar, então, que as bactérias são componentes normais do ejaculado do varrão, existindo relatos de concentrações acima de 10⁹ UFC/mL (Althouse *et al.*, 2000; Althouse e Lu, 2005).

Em condições de monta natural, a contaminação de um ejaculado parece ter pouco efeito sobre a fertilidade (Althouse *et al.*, 2000). No entanto, quando tecnologias são incorporadas ao manejo reprodutivo, como, por exemplo, o processamento do sêmen e IA, pode haver introdução de fatores que potencializam os efeitos lesivos das bactérias sobre os espermatozoides. Tal situação foi agravada pela crescente prática do uso de diluidores de longa duração (>4 dias), nos programas de IA. Tanto o grau de contaminação bacteriana durante a coleta e processamento do sêmen, quanto o tempo de armazenamento das doses, contribuem para os efeitos espermicidas das bactérias (Althouse *et al.*, 2000; Althouse, 2008).

As bactérias parecem exercer seus efeitos espermicidas diretamente (Auroux *et al.*, 1991; Diemer *et al.*, 1996; Althouse *et al.*, 1998). Em experimentos controlados, demonstrou-se que a redução da motilidade e a indução da aglutinação espermática foi exibida em amostras de sêmen, após uma relação espermatozóide:bactéria de 1:1. Além disso, os efeitos da contaminação bacteriana no sêmen suíno não são imediatos, necessitando de 36 a 48 horas de armazenamento para que sejam observados (Althouse *et al.*, 2000).

As bactérias são organismos muito resistentes e com alta capacidade de sobrevivência e adaptação a uma grande variedade de condições. Como os diluidores de sêmen são produzidos, especificamente, para nutrir e prolongar a viabilidade espermática *in vitro*, estes mesmos atributos o tornam um meio de cultura em potencial,

onde as bactérias podem prosperar (Althouse e Lu, 2005).

Para minimizar os efeitos da contaminação bacteriana no sêmen diluído, uma alternativa seria o armazenamento do sêmen a temperaturas inferiores a 15°-18°C, uma vez que nesta faixa de temperatura não há completo impedimento da multiplicação bacteriana (Weitze, 1990b). Com a queda da temperatura do meio, há mudança na fluidez da membrana plasmática acompanhando a queda da taxa de crescimento e metabolismo. Este fenômeno é usado para reduzir o metabolismo e induzir a dormência celular no sêmen diluído. Entretanto, de acordo com Althouse e Lu (2005), embora seja benéfico para a longevidade espermática, a redução da temperatura pode ser ainda mais benéfica para as bactérias contaminantes, uma vez que estas possuem o maquinário intracelular necessário para se adaptar a temperaturas mais baixas. Desta forma, todas as bactérias possuem sua temperatura ótima (T_o) para crescimento. Assim, quando são expostas a temperaturas acima desta T_o , há aumento na fluidez da membrana plasmática, com concomitante alteração da função celular e queda no crescimento. Diante disto, quando se busca a eliminação das bactérias de um diluidor, esta adaptabilidade térmica pode se tornar um desafio, mesmo na presença de níveis adequados de antibióticos, ao qual estas são sensíveis. No geral, com a queda da temperatura, os níveis de antibióticos devem aumentar substancialmente. Supõe-se que a explicação para a mudança na sensibilidade bacteriana aos antibióticos se deva à alterações na permeabilidade da membrana e interações ligantes-receptores, temperatura dependente. Estudos recentes suportam haver necessidade da elevação da temperatura na sensibilidade das bactérias aos antibióticos utilizados nos diluidores.

Um melhor entendimento sobre o comportamento bacteriano no sêmen diluído pode ajudar no desenvolvimento de

estratégias durante o processamento e armazenamento do sêmen, visando-se eliminar a contaminação de forma efetiva. Estratégias que considerem ser o crescimento bacteriano temperatura dependente, bem como um aumento da atividade antimicrobiana diante de elevações desta temperatura, são válidas para o controle efetivo da contaminação bacteriana (Althouse e Lu, 2005).

2.4.4.2. Controle da qualidade microbiológica do sêmen

Na maioria das vezes, o tecido testicular e as glândulas sexuais acessórias do varrão são livres de bactérias, de forma que a contaminação bacteriana do ejaculado ocorre durante a coleta de sêmen (Martin-Rillo *et al.*, 1998). As fontes de contaminação podem ser grosseiramente divididas em contaminação de origem animal e não animal. Normalmente, estas contaminações tem origem única (varrão, pessoa) em determinada granja/central. Tais fontes únicas fornecem as mesmas ou diferentes cepas bacterianas, em momentos diferentes. Do mesmo modo, diferentes fontes de contaminação podem ser encontradas (Althouse e Lu, 2005; Althouse, 2008). As fontes de contaminação bacterianas mais comuns do sêmen suíno estão descritas na tabela 4.

Para minimizar a contaminação bacteriana é importante a realização de boas práticas de higiene pessoal e sanidade geral pelos funcionários da central de coleta de sêmen (Althouse, 2008).

Pessoas que tem contato com qualquer material que será usado na coleta e processamento do sêmen, ou que estão envolvidas na coleta precisam estar cientes que podem ser uma fonte de contaminação ou que podem agir como fômite na transferência de contaminação. Nestas situações, a lavagem cuidadosa das mãos

e/ou uso de luvas de proteção deve ser enfatizada. Estas pessoas devem evitar qualquer contato de suas mãos desprotegidas com materiais que irão entrar em contato com o sêmen ou com o diluidor. Da mesma forma, pessoas com infecções respiratórias devem evitar a contaminação de materiais do laboratório, do sêmen e/ou dos diluidores através de tosse e espirros,

sendo fundamental, desta forma, o uso de máscaras. Toucas e redes de cabelo devem ser usadas pelas pessoas que realizam a coleta ou que se encontram envolvidas com o processamento do sêmen no laboratório. Uniformes limpos, botas limpas e de uso exclusivo na central devem sempre estar disponíveis (Althouse, 2008).

Tabela 4: Fontes de contaminação bacteriana do sêmen suíno diluído

De origem animal	De origem não animal
Fezes	Água
Fluidos do divertículo prepucial	Água purificada (destilador, tanques de armazenamento)
Pele e pêlos	Instalações (cama das baias, ração)
Secreções respiratórias	Sistemas de ventilação/ar
Humanos (pele, cabelos, pêlos, etc)	Valas/drenos

Fonte: Adaptado de Althouse e Lu (2005)

Nas baias dos machos, a remoção regular dos resíduos orgânicos, seguida por limpeza com desinfetantes de amplo espectro é importante. Além disso, a região ventral do abdômen do varrão deve ser limpa e seca sempre antes da coleta, devendo ser aparados os pêlos situados ao redor do prepúcio, visando-se a prevenção do acúmulo de material orgânico neste local e, conseqüentemente, de sua introdução no ejaculado no momento da coleta. O varrão acumula grande volume de fluido no divertículo prepucial, sendo este fluido rico em bactérias (Aamdal *et al.*, 1958).

Na tabela 5 estão sumarizadas as práticas de mínima contaminação a serem utilizadas nas centrais de inseminação. Desta forma, no momento em que o macho entra na baía de higienização, este fluido deve ser evacuado manualmente. Em seguida, toda a região do divertículo e ao seu redor deve ser limpa e seca com papel toalha. Durante este procedimento, uma luva deve ser usada visando proteger a mão do coletador. No momento da coleta, o pênis deve ser posicionado de forma a minimizar a contaminação gravitacional do ejaculado.

Além disso, a fração pré-espermática deve ser descartada (Althouse e Lu, 2005; Althouse, 2008; Althouse *et al.*, 2010). Frequentemente, a fonte de contaminação do sêmen é a água usada no preparo do diluidor. Desta forma, uma maneira importante de se controlar a contaminação bacteriana no sêmen é monitorar de forma regular a fonte de água do laboratório (Althouse *et al.*, 2000; Althouse, 2008).

Se as medidas preventivas falham em controlar adequadamente os riscos de contaminação do sêmen, haverá redução da qualidade seminal, com conseqüências indesejáveis na longevidade seminal e na fertilidade. Vale salientar, neste momento, que mesmo que se tomem todas estas medidas visando-se a redução da carga bacteriana, é utopia esperar que o sêmen diluído esteja totalmente livre de qualquer contaminação. Por isso, o uso de antibióticos nos diluidores é essencial para o controle microbiológico seminal, principalmente, nas centrais de inseminação onde tecnologias reprodutivas são usadas rotineiramente (Althouse, 2008).

Tabela 5: Práticas recomendadas para minimizar a contaminação bacteriana do ejaculado

Preparação do varrão/ momento da coleta:

1. Pêlos prepuciais devem ser mantidos sempre aparados;
 2. Duas luvas devem ser usadas, sendo a luva externa descartada após higienização do varrão, permitindo que uma luva limpa seja usada para a coleta do sêmen;
 3. Luvas de vinil descartáveis ou desinfetantes para a mão devem ser usadas durante as coletas para minimizar a contaminação do sêmen e reduzir o risco de contaminação cruzada entre varrões;
 4. Limpeza da abertura prepucial e das áreas próximas com papel toalha;
 5. Evacuar manualmente os fluidos do divertículo prepucial antes da exposição do pênis do macho;
 6. Segurar o pênis de forma perpendicular ao macho para minimizar contaminação com fluido prepucial devido a gravidade;
 7. Descartar a fração pré-espermática e as frações com gel;
 8. Descartar o filtro usado durante a coleta antes de passar o sêmen coletado para o interior do laboratório.
-

Processamento do sêmen/sanitização do laboratório e das baias

1. Estimule o uso de materiais descartáveis para minimizar contaminação cruzada;
 2. Quando do uso de materiais não descartáveis, e que não podem ser esterilizados pelo calor, lavar com detergente para laboratório (livre de resíduos), enxaguar com água destilada e com álcool 70%, secar bem e enxaguar com diluidor primeiro antes do primeiro uso do dia seguinte;
 3. Desinfete os equipamentos do laboratório ao final do dia com detergente e enxague,
 4. O chão do laboratório deve ser desinfetado ao final do dia (produtos fenólicos, formalina, etc);
 5. Coloque a quantidade dos produtos a serem usados imediatamente após abrir em recipiente de tamanho adequado;
 6. Luz ultra violeta pode ser instalada para colaborar na sanitização de materiais reutilizados e do laboratório;
 7. As baias dos machos devem ser incluídas em uma rotina de limpeza que impeça o acúmulo de material orgânico;
 8. A área de coleta de sêmen e o manequim devem ser limpos diariamente e desinfetados ao final do dia de coleta.
-

Fonte: 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

Grande número de pesquisadores têm citado que a sobrevivência dos espermatozoides do varrão durante o armazenamento é definitivamente influenciada pela taxa de diluição (Polge, 1956b; Kvasnizkij *et al.*, 1965; Baranov e Vysotskii, 1971; Paquignon *et al.*, 1982, citados por Perez Marcos *et al.*, 1991).

Entretanto, não há um consenso sobre qual seria a taxa de diluição ótima para a máxima sobrevivência espermática.

Borton *et al.* (1965) reportaram que o sêmen do varrão pode ser mantido em altas taxas de diluição, enquanto DuMesnil *et al.* (1971) e Konig (1979) observaram que taxas de diluição ótimas variaram entre 1:2 a 1:8. A taxa ótima de diluição é de 1:3 de acordo com Kim *et al.* (1976,1977), e de 1:4 para Cerovsky (1982). Polge (1956b) e Niwa *et al.* (1959) estabeleceram que taxas

de diluição acima de 1:10 poderiam prejudicar a resistência das células espermáticas ao resfriamento, embora a extensão dos danos dependesse da concentração e da motilidade espermática após a coleta.

A taxa de diluição é uma variável associada à concentração espermática total do ejaculado e à concentração espermática da dose inseminante, podendo interferir diretamente no período de preservação e na viabilidade das células espermáticas (Martín-Rillo *et al.*, 1994).

Estudos preliminares envolvendo taxas de diluição indicam que uma diluição prévia ao armazenamento, de 1:1 (sêmen:diluidor, v/v) conferiu ao sêmen uma motilidade inferior após o armazenamento em relação às amostras diluídas com taxas de diluição de 1:2, 1:4 e 1:8 (Dziuk, 1958). Em contrapartida, Desjardins e Hafs (1962) realizaram um estudo com espermatozoides de touro e observaram que o sêmen congelado hiperconcentrado, com 200×10^6 espermatozoides/mL sobreviveu melhor ao armazenamento após o descongelamento.

Martin-Rillo *et al.* (1994) consideraram como ótima, uma taxa de diluição de 1:10. Por sua vez, Ruvalcaba (1994) afirma serem ótimas taxas de diluição entre 1:5 e 1:15, dependendo da concentração espermática do ejaculado. De acordo com Flowers (1996) as doses apresentando uma pequena taxa de diluição (<1:5) foram associadas com baixa viabilidade espermática, devido à carência de substratos energéticos, bem como à perda da capacidade tamponante do meio. Johnson *et al.* (2000) afirmam que a taxa de diluição mais comumente utilizada é a de 1:10.

Perez Marcos *et al.* (1991) demonstraram que a taxa de diluição dos espermatozoides do varrão durante o armazenamento a 15°C no diluidor Kiev foi importante para a máxima manutenção da motilidade e da integridade acrossômica dos espermatozoides. De acordo com os

autores, quando as taxas de diluição se distanciaram do intervalo entre 1:8 a 1:11, houve um declínio acentuado da viabilidade espermática, quando o sêmen foi armazenado por mais de 72 horas.

A taxa de diluição ótima, provavelmente, difere para os diferentes diluidores. A concentração espermática inicial do ejaculado e as características do diluidor, tais como pH inicial, capacidade tamponante e pressão osmótica podem influenciar a taxa de diluição adequada durante o armazenamento. Certamente, a diluição de 1:10 da fração rica em espermatozoides de um ejaculado, com concentração média de 60×10^6 espermatozoides/mL durante o armazenamento, não se compara à diluição de 1:10, envolvendo o ejaculado total, com uma concentração média de 20×10^6 espermatozoides/mL durante o armazenamento (Perez Marcos *et al.*, 1991).

Além disso, a concentração de ácido láctico em uma amostra de sêmen armazenada será proporcional à concentração espermática. Desta forma, um diluidor com pequena capacidade tamponante pode necessitar de maiores taxas de diluição (Perez Marcos *et al.*, 1991).

Quando as taxas de diluição excedem 1:15 ocorre redução da viabilidade espermática e da fertilidade, podendo esta redução estar relacionada ao choque osmótico (Flowers, 1996; Levis, 1997). As altas taxas de diluição têm sido reconhecidas por seus efeitos negativos sobre a viabilidade dos espermatozoides do varrão, há muitos anos (Kvasnizkij *et al.*, 1965, citado por Perez Marcos *et al.*, 1991; Baranov e Vysotskii, 1971).

Do ponto de vista prático, altas taxas de diluição são um problema maior do que pequenas taxas de diluição, uma vez que manter uma dose inseminante completa e pronta para a inseminação armazenada em um contêiner é mais complexo do que armazenar o sêmen sob pequenas taxas de

diluição, adicionando o volume de diluidor necessário para a preparação das doses apenas no momento das inseminações (Perez Marcos *et al.*, 1991).

O armazenamento do sêmen submetido a taxas de diluição adequadas tem pouca importância se o mesmo for utilizado dentro de 24 horas após a coleta. No entanto, à medida que o tempo de armazenamento aumenta, as taxas de diluição se tornam um importante fator a ser considerado (Perez Marcos *et al.*, 1991).

Quando utilizou-se doses inseminantes contendo 5×10^9 de espermatozoides houve decréscimo da motilidade espermática, em relação às doses contendo 1 ou 3×10^9 de espermatozoides, ou seja, apresentando maiores taxas de diluição. A motilidade inferior encontrada em doses contendo menores taxas de diluição tem sido atribuída ao pobre ambiente metabólico gerado nestas doses (Alexpoulos *et al.*, 1996). Almond *et al.* (1994) afirmam que o sêmen suíno diluído deveria ter no mínimo $1,5 \times 10^9$ e no máximo 6×10^9 de espermatozoides por dose inseminante, em volume mínimo de 50 mL, por ser a porca volume dependente, no que diz respeito à manutenção de boas taxas de fertilidade.

Windson *et al.* (1993) estudou os efeitos lesivos da peroxidação lipídica nos espermatozoides do carneiro e observou que quando os espermatozoides foram incubados a uma concentração de 1×10^8 /mL, com 400 μ M de hidroxinoneal (HNE), um produto da peroxidação lipídica, a motilidade foi abolida em 60 minutos. Quando da utilização de 200 μ M, tal efeito foi observado em 120 minutos. Em contrapartida, o armazenamento de 1×10^9 espermatozoides/mL resistiu à incubação com mais de 200 μ M de HNE por mais de 120 minutos sem que houvesse qualquer prejuízo à motilidade espermática.

Na monta natural, há deposição de grande número de espermatozoides diluído em um grande volume de plasma seminal. Quando

o sêmen é processado para a IA, o número de espermatozoides e a proporção de plasma seminal em cada dose são reduzidos (Kirkwood *et al.*, 2008). O plasma seminal afeta a fisiologia espermática de forma que, *in vitro*, previne ou reverte a capacitação espermática dos espermatozoides submetidos ao processo de congelamento/descongelamento ou a uma alta taxa de diluição, associada à sexagem por citometria de fluxo (Kirkwood *et al.*, 2008).

Existem vários estudos sobre as mudanças que ocorrem quando o sêmen é diluído. A diluição dos espermatozoides de mamíferos em soluções isotônicas provoca a ativação ou excitação da motilidade. No entanto, se a diluição é excessiva, observa-se a perda permanente da motilidade, da atividade metabólica e da capacidade fertilizante *in vivo*, caracterizando o denominado “efeito diluição” (Maxwell e Johnson, 1999).

Apesar disso, as informações envolvendo os efeitos do plasma seminal sobre a fertilidade dos espermatozoides são conflitantes. Desta forma, variações na presença, ausência ou na concentração de certos componentes, provavelmente proteínas do plasma seminal, devem ser responsáveis pela variabilidade dos efeitos observados sobre a fertilidade espermática (Maxwell e Johnson, 1999).

Durante o processamento do sêmen visando-se a sexagem espermática por citometria de fluxo, os espermatozoides são submetidos à coloração nuclear, à exposição a laser e a altas taxas de diluição. Antes da separação, os espermatozoides do varrão são diluídos 20 vezes, e incubados por uma hora a 35°C, de forma a permitir uma coloração homogênea. Além disso, os espermatozoides são diluídos novamente por mais 100 vezes durante a sua passagem pelo separador de células (Catt *et al.*, 1997). Estas altas taxas de diluição são deletérias e provocam uma redução da motilidade e

viabilidade espermáticas (Maxwell e Johnson, 1999).

Estes efeitos podem ser minimizados através do uso de diluidores apropriados, contendo sais balanceados, fonte de energia, gema de ovo e algumas proteínas. Essa alta diluição, com remoção do plasma seminal, leva a desestabilização das membranas plasmáticas espermáticas, com consequente indução da capacitação. No entanto, adicionando-se 10% de plasma seminal ao diluidor utilizado na manipulação do sêmen, observa-se aumento da percentagem de espermatozoides vivos e com acrossomas intactos após a citometria de fluxo (Maxwell e Johnson, 1999).

Presume-se que um varrão associado com altas taxas de parto e grande número de leitões nascidos produza ejaculados de forma consistente ou doses inseminantes que contenham um número suficiente de espermatozoides, capazes de atender estas demandas. Desta forma, é razoável assumir, do ponto de vista fisiológico, que existam duas características básicas diretamente responsáveis pela influência do varrão no tamanho da leitegada: o número de espermatozoides inseminados, bem como o percentual capaz de fertilizar os óocitos (Flowers, 2002).

Salisbury *et al.* (1961) propuseram uma teoria que relaciona a fertilidade do macho e as características seminais que se assemelha à uma curva assintótica positiva. A princípio, quando o número de espermatozoides produzidos e inseminados for pequeno, a fertilidade do macho será baixa. Entretanto, aumentando-se o número de espermatozoides/dose inseminante haverá um aumento da fertilidade. A magnitude desta resposta diminui gradativamente à medida que o número de células espermáticas inseminadas aumenta, até chegar a um platô. A partir deste ponto, qualquer aumento do número de espermatozoides inseminados não afetará a fertilidade do macho. De acordo com os

autores, esta é a curva padrão de fertilidade dos machos. A razão fisiológica para este padrão é o conceito de que um número finito de espermatozoides competentes deva estar presente nas tubas uterinas no momento da fertilização.

O volume da dose inseminante utilizado mundialmente, em suínos, varia de 80 a 100 mL para inseminações tradicionais, sendo o volume mínimo de 50 mL (Almond *et al.*, 1998), visando-se assegurar o transporte de um número suficiente de espermatozoides para a junção útero-tubárica. Este volume pode variar, podendo ser reduzido de acordo com o local de deposição do sêmen. A concentração espermática, normalmente utilizada para a IA comercial em suínos, é de 2,5 a 3×10^9 de espermatozoides/dose (Bracken *et al.*, 2003).

Os varrões exibem padrões de fertilidade baseados no número de espermatozoides inseminados, sendo que estes padrões diferem entre os mesmos (Flowers, 2002). Assim, Johnson *et al.* (1981, 1982) demonstraram que a fertilidade de varrões pode diferir quando as inseminações são feitas com doses apresentando a mesma concentração espermática. Nestes estudos, foram utilizadas doses com 3×10^9 de espermatozoides para inseminar porcas, uma única vez, entre 12 e 24 horas após o início do cio. Foram inseminadas 3.300 porcas, em 36 diferentes granjas. A variação média no tamanho da leitegada, entre 24 varrões, foi de 8,8 a 12,2 leitões.

Xu *et al.* (1998) não observaram diferenças entre varrões, embora tenham demonstrado efeito positivo do número de espermatozoides inseminados sobre o tamanho da leitegada. Neste experimento, utilizou-se doses inseminantes de 2 ou 3×10^9 espermatozoides, para inseminar 444 porcas. A variação no tamanho médio de leitegada foi de 10,2 a 11,5 leitões, quando a dose inseminante foi de 3×10^9 de espermatozoides e de 9,1 a 10,1 leitões,

para doses inseminantes de 2×10^9 de espermatozoides.

Tem sido estabelecido que um número crítico de espermatozoides competentes deva chegar à tuba uterina para que se obtenha uma fertilidade ótima. Desta forma, parece razoável que este número crítico seja alcançado através de uma combinação, envolvendo o número e a qualidade dos espermatozoides inseminados. Entretanto, para que isso seja viável fisiologicamente, três situações precisam ocorrer: 1) o aumento do número de espermatozoides inseminados deve aumentar o número de espermatozoides alcançando as tubas uterinas; 2) a entrada e a retenção dos espermatozoides nas tubas precisa ser diferente entre varrões; e 3) o transporte e a entrada de espermatozoides nas tubas deve ser independente da qualidade espermática. Existem evidências para a existência de cada um destes eventos. Inicialmente, Baker *et al.* (1968) inseminaram leitoas com 1, 5 ou 10×10^9 espermatozoides e determinaram o número de células presentes nas tubas 12 a 16 horas após as inseminações. Determinou-se então, uma relação positiva entre o número de espermatozoides inseminados e o número de células presentes nas tubas. Em segundo plano, observou-se um efeito significativo dos varrões quanto ao número de espermatozoides recuperados do istmo caudal e tuba uterina próximo ao momento da ovulação por Mburu *et al.* (1995). Finalmente, First *et al.* (1968) demonstraram que os espermatozoides mortos são transportados e alcançam as tubas com eficiência similar às células espermáticas vivas. Desta forma, o ajuste do número de espermatozoides nas inseminações parece ser fisiologicamente plausível para se aumentar o tamanho da leitegada.

Com o advento da IIUP (Inseminação intra uterina profunda), as doses inseminantes podem ser depositadas a 8-55 cm da junção útero-tubárica (Martinez *et al.*, 2002).

Quando comparada à IA tradicional (pós cervical com 3×10^9 de espermatozoides em 80-100 mL de diluidor), uma redução de 20 vezes no número de espermatozoides inseminados e uma redução de 8 a 20 vezes no volume pôde ser usada, sem afetar a taxa de parto e o tamanho da leitegada, quando inseminou-se porcas desmamadas com cio induzido. No entanto, Day *et al.* (2003), inseminaram 105 porcas desmamadas em cio natural, sendo a metade destas inseminada utilizando-se a técnica de IIUP com 150×10^6 de espermatozoides em 5 mL de diluidor e a outra metade utilizando a IA convencional, como grupo controle. As porcas foram inseminadas 2-3 vezes/cio. Não houve diferenças entre as taxas de gestação e de parto entre os grupos. Entretanto, observou-se diferença ($p < 0,01$) quanto ao número de nascidos totais ($10,5 \pm 0,49$ vs $12,9 \pm 0,49$, para a IIUP e a IA convencional, respectivamente).

O número e a qualidade dos espermatozoides inseminados determinam o impacto do varrão no tamanho da leitegada. Assim, o aumento do tamanho da leitegada, em situações onde se usa a monta natural, resulta, provavelmente, de melhoria da qualidade seminal. Isto se deve ao fato de que a maioria dos varrões apresenta espermatozoides suficientes em seus ejaculados para maximizar o número de espermatozoides que alcançam as tubas uterinas. Em contrapartida, em situações onde se usa a IA, o aumento do tamanho da leitegada pode ocorrer de várias maneiras diferentes, incluindo-se a melhoria na qualidade do sêmen, o aumento do número de espermatozoides inseminados, bem como a utilização de estimativas da qualidade espermática para ajustar o número de espermatozoides inseminados (Flowers, 2002).

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

Quando os espermatozoides do varrão, do carneiro e do touro são bruscamente resfriados de 15°C para 0°C, levando ao chamado choque térmico, há perda irreversível da motilidade e da atividade metabólica (Milovanov, 1932; Blackshaw, 1954; Mann e Lutwak-Mann, 1955; Mayer, 1955; Blackshaw e Salisbury, 1957). Tem sido citada, ainda, a perda de proteínas intracelulares e de enzimas (Mann e Lutwak-Mann, 1955), alterações nos cátions celulares (Blackshaw e Salisbury, 1957; Quinn e White, 1966), bem como aumento da permeabilidade das membranas (Lasley *et al.*, 1942; Hancock, 1951), além das lesões observadas no acrossoma (Hancock, 1952; 1957).

Quinn *et al.* (1968) afirmaram que os espermatozoides do carneiro se tornam mais resistentes ao choque térmico quando incubados a 30°C, por, no mínimo, 30 minutos antes do resfriamento.

Pursel *et al.* (1972) observaram que no sêmen suíno não diluído, os acrossomas sofreram alteração, sendo a motilidade reduzida pelo resfriamento a 0°, 5°, 10° ou 15°C por 10 minutos. No entanto, os acrossomas se tornaram mais resistentes ao choque térmico quando incubados por 2,5 horas a 4,5 horas a 30°C. Os autores concluíram também que os espermatozoides da fração rica do ejaculado são menos sensíveis ao resfriamento do que os do ejaculado total.

Weber (1989) avaliou o efeito do resfriamento do sêmen fresco a partir de 35°C até três diferentes temperaturas (25°C, 15°C ou 5°C), considerando-se três diferentes tempos de “holding time” (0, 1 ou 3 horas), antes do resfriamento. A motilidade e a integridade acrossômica do sêmen resfriado até 5°C foram, independentemente do tempo de “holding

time” (HT), reduzidas significativamente em comparação às amostras resfriadas até 25°C ou 15°C. No entanto, os valores de motilidade e integridade do acrossoma para o resfriamento até 5°C, mas com um HT prévio de três horas, foram aproximadamente duas vezes maiores do que para os HT de apenas 0h ou 1h. Em outro experimento, quando se utilizou o HT de 4 horas a 25°C, observou-se maiores valores de motilidade e de integridade acrossômica, quando do resfriamento até 5°C. Comparou-se, ainda, três temperaturas (25°C, 20°C e 15°C) e quatro períodos de incubação (HT) (0, 4, 8 e 24 horas), antes do resfriamento a 5°C. O sêmen incubado por 24 horas a 20°C apresentou maior motilidade (68%), embora não tenha havido diferenças quanto ao percentual de acrossomas íntegros (74%) em comparação ao HT de quatro horas a 25°C. O sêmen sem HT e resfriado a 5°C apresentou os piores valores de motilidade (19%) e de acrossomas normais (62%).

Weitze *et al.* (2000) observaram que o HT a 20°C por diferentes períodos, antes do resfriamento a 5°C, parece ser mais eficiente do que o HT a 25° ou 15°C. No entanto, o período de duração do HT (0, 4, 8 ou 24 horas) parece ser mais importante do que a temperatura de incubação (25°, 20° ou 15°C). De acordo com Tamuli e Watson (1994) houve um aumento gradual da motilidade e da percentagem de acrossomas normais quando o sêmen não diluído foi submetido a um período de incubação de 4 a 16 horas. No entanto, observou-se um aumento de espermatozoides vivos com lesões acrossômicas, após 16 horas de incubação.

Quando o sêmen suíno foi congelado utilizando-se, previamente, três diferentes HT's (3, 10 e 20 horas), durante o resfriamento, investigou-se a integridade da membrana plasmática e a motilidade durante o resfriamento e após o descongelamento. Neste experimento, não observou-se efeito significativo ($p < 0,05$)

dos HT's, durante o resfriamento, na integridade da membrana plasmática e na motilidade. No entanto, quando da avaliação após o descongelamento, a integridade da membrana foi maior ($p < 0,05$) para os HT's de 10 e 20 horas em relação ao de três horas, sendo que a percentagem de espermatozoides móveis caiu significativamente quando utilizou-se o HT de 20 horas (Eriksson *et al.*, 2001).

Ohata *et al.* (2005) afirmam que um período de HT longo (20 horas), antes do congelamento do sêmen suíno, garantiu maior integridade acrossômica após o descongelamento. Os autores avaliaram a influência do HT pré- congelamento sobre a qualidade seminal. Foram comparados dois tempos de HT (1,5 horas e 20 horas) a 20°C. Não houve diferença quanto à motilidade e integridade de membrana para o HT de 20 horas, embora a percentagem de acrossomas normais tenha sido superior, quando comparada ao HT de 1,5 horas.

Desde que Lasley e Bogart (1944) descreveram uma pronunciada sensibilidade dos espermatozoides do varrão ao resfriamento, este fenômeno tem impedido o desenvolvimento de técnicas de preservação que permitam reduzir a temperatura de armazenamento abaixo dos 15°C e ainda manter taxas de concepção aceitáveis. Entretanto, sabe-se que se o ejaculado do varrão for mantido a temperaturas acima de 15°C, por várias horas, os espermatozoides adquirem certa resistência ao choque térmico, sendo este fenômeno temperatura dependente, além de não requerer contato com o plasma seminal ou diluidor (Weitze *et al.*, 2000).

O chamado "Holding Time" de 2 horas tem sido um protocolo padrão, utilizado no mundo inteiro quando se trata do uso de sêmen de varrões a ser diluído e resfriado a 17 - 18°C. Entretanto, o período recomendado para o sêmen a ser resfriado a 5°C, é de 4 horas (Foote, 2002).

Não se sabe, até o presente momento, quais são as mudanças que ocorrem e que conferem esta resistência às células espermáticas. Existem evidências, entretanto, de que estas mudanças não dependam de alterações na configuração das proteínas da membrana plasmática dos espermatozoides, nem nos carboidratos da superfície da membrana. Acredita-se, no entanto, estarem relacionadas à dupla camada lipídica, bem como a mudanças na fluidez da membrana (Weitze *et al.*, 2000).

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

A taxa de resfriamento é o fator mais importante no controle da sobrevivência espermática durante o processo de resfriamento e/ou congelamento (Pursel e Parks, 1985). Mazur (1985) estabeleceu que cada tipo celular tem uma taxa de resfriamento ótima para sobreviver ao processo de congelamento.

Segundo Silva Filho *et al.* (1994) a taxa de resfriamento ideal para os espermatozoides é um dos assuntos de maior importância, no que diz respeito à conservação da motilidade e fertilidade do sêmen diluído, resfriado e/ou transportado, sendo inúmeros os fatores relacionados com a manutenção da longevidade da célula espermática *in vitro*, como a individualidade do macho; o tipo de colheita – total ou fracionada; o tempo decorrido da colheita à diluição; a presença de macromoléculas no diluidor; a taxa de diluição; a concentração espermática usada; o tipo de envase; a relação CO₂ /O₂; a curva de resfriamento e a temperatura final de armazenamento.

A maioria dos pesquisadores têm se preocupado com a temperatura final de armazenamento, em detrimento de estudos envolvendo a taxa ideal de resfriamento (Silva Filho *et al.*, 1994). Moore *et al.*

(1976) e Watson (1995) ressaltaram que a velocidade de resfriamento é de grande importância para a extensão do dano causado pelo choque térmico. Segundo os autores do primeiro estudo, com taxas de resfriamento de 10-15°C por minuto já são notados efeitos do choque térmico sobre os espermatozoides. Sabe-se ainda, que os espermatozoides recém ejaculados são mais sensíveis ao choque térmico que os incubados por certo período e depois resfriados (Lasley e Bogart, 1944).

De acordo com Dziuk (1958) o resfriamento ocorre, normalmente, a uma taxa menor que 5°C por hora, sendo a motilidade reduzida durante o armazenamento, caso o resfriamento seja realizado a taxas mais rápidas.

É importante salientar que até 15°C, a taxa de resfriamento não é o fator mais importante para a manutenção da viabilidade espermática (Weber, 1989). Entretanto, para o resfriamento de 20°C até 5°C, a taxa ideal de resfriamento deveria ser lenta: de -0,005 ou -0,012°C/minuto, para o sêmen equino (Kayser et. al, 1992).

Roner *et al.* (2006) desenvolveu um contêiner próprio para o resfriamento e conservação do sêmen de suíno a 17°C ou 5°C. Neste contêiner, foi utilizada uma curva de resfriamento lenta de -0,18°C/min (37°C a 17°C), -0,0049°C/min (17°C a 8°C) e -0,0066°C/min (8°C a 5,38°C) visando-se a obtenção de uma temperatura final de armazenamento de 5°C. Para a temperatura de 17°C, os resultados de motilidade e vigor foram de 58,75% e 3,12, respectivamente, sendo para a de 5°C, de 43,13% e 2,87, respectivamente, quando o sêmen foi diluído em diluidor BTS[®]. Quando os autores usaram o diluidor de longa duração X-Cell[®], os resultados foram de 61,87% e 3,25 a 17°C e de 55% e 3,25 a 5°C, respectivamente, para o mesmo período de armazenamento.

Weitze *et al.* (2000) submetem o sêmen à quedas de temperatura a partir de 35°C em

etapas, até 25°, 15° ou 5°C, ou ao resfriamento direto, de 35°C para 25°, 15° e 5°C, envolvendo um tempo total de queda da temperatura de 80 minutos. De acordo com os autores, houve uma queda significativa da motilidade e da percentagem de acrossomas normais após o resfriamento direto de 35°C até 5°C (de 81,7% para 12,0% na motilidade e de 81,7% para 44,9%, quanto ao percentual de acrossomas normais). No entanto, estas alterações foram significativamente atenuadas quando a redução da temperatura foi gradual.

Nascimento *et al.* (1998) avaliaram o efeito da taxa de resfriamento (lenta ou rápida) no sêmen resfriado a 16°C ou a 5°C sobre a motilidade, vigor e morfologia dos espermatozoides suínos. A duração do período de resfriamento até 16°C foi de 4 horas, sendo de 7 horas para 5°C. A preservação da motilidade e longevidade espermáticas foram satisfatórias para o resfriamento até 16°C, por até 72 horas de estocagem, quando o sêmen foi diluído no diluidor Kiev[®] ou no de mínima contaminação. Entretanto, quando o sêmen foi diluído em diluidor lactose-gema de ovo, houve queda significativa dos parâmetros avaliados nas primeiras 72 horas. Assim, para o sêmen resfriado a 5°C, a motilidade e o vigor só foram preservados adequadamente no diluidor de mínima contaminação, tanto para o resfriamento lento quanto para o rápido. Para os diluidores Kiev[®] e lactose-gema observou-se queda da motilidade e vigor para menos de 10% e de 1, respectivamente, após 24 horas de armazenamento. Além disto, não se observaram diferenças significativas quanto às lesões acrossômicas encontradas, entre o resfriamento lento e rápido para as duas temperaturas.

Para estudar os efeitos das taxas de resfriamento sobre o sêmen suíno, Crowell (2009) submeteu o sêmen a três tratamentos, a saber: 1- taxa de resfriamento lenta - o sêmen alcançou a

temperatura ambiente, de forma lenta, antes de ser colocado em uma unidade de armazenamento de sêmen, mantida a 17-18°C; 2- taxa de resfriamento média – o sêmen foi colocado, após a diluição, imediatamente na unidade de armazenamento a 17-18°C e 3- taxa de resfriamento rápida - o sêmen diluído foi colocado em uma incubadora mantida a 12°C, por uma hora, antes de ser transferido para a unidade de armazenamento a 17-18°C. Não houve diferença significativa ($p>0,05$) na qualidade seminal para as taxas de resfriamento lenta e média, e a taxa de resfriamento rápida resultou em piores resultados. Apesar disso, mesmo para a taxa de resfriamento rápida, os valores de motilidade não foram inferiores a 60%. De acordo com Flowers (1997), não há diferença na fertilidade do sêmen apresentando motilidade acima de 60%.

2.4.8. Influência da temperatura final de armazenamento do sêmen

O principal objetivo quando do armazenamento do sêmen é manter a viabilidade espermática no decorrer deste período. Isto pode ser feito através da redução do metabolismo espermático, tanto pela diluição quanto pela redução da temperatura de armazenamento (Weitze, 1990b).

No entanto, a sensibilidade do sêmen do varrão ao choque térmico torna as temperaturas de armazenamento acima de 15°C necessárias, o que limita a redução do metabolismo celular (Watson e Plummer, 1985; Weitze, 1991). Esta maior sensibilidade está relacionada a uma maior relação de ácidos graxos insaturados:saturados nos fosfolípidos da membrana plasmática e à baixa concentração de colesterol, que possui, ainda, uma distribuição assimétrica na membrana. Estes fatores geram uma

membrana mais aberta, menos estável e coesa (De Leeuw *et al.*, 1990; White, 1993).

Na suinocultura comercial atual utiliza-se, rotineiramente, o sêmen do varrão armazenado entre 15°C e 20°C até seu uso na IA. Estudos têm demonstrado que o potencial de fertilidade do sêmen suíno, diluído e armazenado a 15°C, é aceitável. Entretanto, quando da exposição a temperaturas inferiores a esta, observa-se o choque térmico e morte das células espermáticas. Para estudar os efeitos do choque térmico sobre as células espermáticas do varrão, tem-se utilizado o resfriamento a 5°C ou até temperaturas inferiores, porque assim há indução dos efeitos indesejáveis do choque térmico, que levam a danos celulares irreversíveis (Althouse *et al.*, 1998).

Paulenz *et al.* (2000) recomendaram que as doses de sêmen deveriam ser usadas até 60 horas pós coleta, ainda que o sêmen não seja exposto a oscilações de temperatura com queda abaixo dos 15°C ou elevação acima dos 20°C durante o período de estocagem e/ou transporte. Segundo estes autores, os efeitos deletérios do choque térmico foram observados quando o sêmen foi resfriado a 10°C, após diluição em BTS, havendo queda significativa da motilidade e da integridade acrossômica, após as 24 horas de armazenamento. Quando o resfriamento foi até 20° ou 25°C, a integridade acrossômica foi pouco afetada, com uma queda total de 4,5% após as 96 horas de estocagem. Entretanto, observou-se uma queda suave da motilidade quando o tempo de armazenamento superou 72 horas, que se acentuou após as 96 horas. A redução da motilidade às 96 horas foi mais acentuada no sêmen armazenado a 25°C do que no estocado à 20°C. Entretanto, não houve diferenças significativas na motilidade e integridade acrossômica no sêmen armazenado a 20° ou a 25°C. No entanto, como a queda da motilidade e da atividade metabólica foram maiores no

sêmen armazenado a 25°C, parece mais apropriado armazená-lo a 20°C. Além disso, observou-se uma redução significativa do pH do meio após 96 horas a 25°C e 20°C, que foi maior, embora sem significância estatística, a 15°C. Entretanto, houve uma queda significativamente maior quando o sêmen foi estocado a 10°C.

A severidade do choque térmico depende da taxa de resfriamento, do intervalo de temperatura e da variação das temperaturas, durante o armazenamento, sendo no geral mais severo quando esta variação é entre 2° e 12°C (Weitze, 1991).

Vários estudos buscam relacionar os efeitos das temperaturas de resfriamento do sêmen com a qualidade seminal, após diferentes períodos de estocagem. Assim, Venumanohararao *et al.* (1991), armazenaram o sêmen do varrão em quatro diferentes diluidores durante 96 horas a 5°C ou a 15°C, concluindo que a motilidade progressiva geral foi maior em todos os diluidores a 15°C. Alexopoulos *et al.* (1996), armazenaram o sêmen diluído em BTS por 96 horas a 17°C e observaram uma redução de 18% na motilidade inicial. Wallgren (1985) armazenou o sêmen por 72 horas a 18°C ou a 24°C, e detectou uma queda significativa tanto da motilidade quanto da integridade acrossômica.

Modificações da membrana têm sido descritas nos espermatozoides suínos expostos a temperaturas abaixo de 8°C. Como consequência, acrossomas comprometidos são considerados parte do fenômeno do choque térmico. No entanto, Althouse *et al.* (1998) não observaram lesões de acrossomas no sêmen suíno armazenado em temperaturas inferiores a 8°C, por mais de 48 horas. Uma explicação possível para este achado pode se dever ao diluidor utilizado, contendo BSA (Androhep®) em sua formulação. Além disso, os autores usaram uma taxa de resfriamento lenta e controlada de 2-4°C/hora, com taxas de diluição que

variaram de 1:7,6 até 1:15,7; que se encontram dentro das recomendadas pela literatura. Entretanto, questionam se estes fatos podem ter exercido um efeito protetor sobre o sêmen. Após 48 horas, a motilidade espermática foi significativamente menor em amostras armazenadas a 12°C do que a 17°C, embora sempre superior a 75%. Não foram observadas diferenças quanto às taxas de parição obtidas quando o sêmen foi armazenado a 12°C ou a 17°C, por mais de 60 horas, que foram de 93% e 95%, respectivamente. O mesmo pode ser dito quanto aos nascidos totais ($11,58 \pm 2,50$ vs $11,61 \pm 2,87$) e nascidos vivos ($10,68 \pm 2,27$ vs $10,63 \pm 2,51$), na mesma ordem descrita anteriormente.

Os resultados de Althouse *et al.* (1998) demonstraram que a temperatura crítica para o choque térmico no sêmen suíno é de 12°C.

De acordo com Katzer *et al.* (2005), o sêmen suíno pode ser mantido a 22°C por 2 ou 8 horas antes do resfriamento a 17°C. Para o sêmen resfriado a 5°C, uma viabilidade espermática similar foi obtida quando da utilização de uma curva lenta de resfriamento, incluindo um tempo de incubação de 24 horas a 17°C ou de 8 horas a 22°C adicionalmente ao tempo de 16 horas a 17°C. Entretanto, os baixos índices de viabilidade obtidos não permitem recomendar o uso de sêmen suíno diluído em BTS e resfriado a 5°C.

A atividade metabólica dos espermatozoides do varrão, preservados em diluidores contendo lipoproteínas da gema de ovo, é afetada por diferentes temperaturas de armazenamento. Neste contexto, Dzienkonska *et al.* (2009) investigaram os efeitos de duas diferentes temperaturas de armazenamento (5°C ou 16°C) na atividade metabólica dos espermatozoides suínos armazenados em diluidor Kortowo (K3), suplementado ou não com frações das lipoproteínas da gema de ovo (FLG). Os autores avaliaram além

da motilidade e da integridade de membrana, a atividade metabólica, incluindo a condição de energia mitocondrial, captação de oxigênio, conteúdo de ATP e produção de L-lactato. Não houve diferenças relevantes na motilidade e integridade de membrana nos espermatozoides, durante o armazenamento em diluidor FLG nos dias 2 e 3 a 5°C, em comparação aos espermatozoides armazenados a 16°C. Isto indica um efeito protetor das frações das lipoproteínas contra o choque térmico. Sabe-se que os espermatozoides suínos são capazes de produzir L-lactato durante a glicólise e sobre condições aeróbicas. Durante o armazenamento em diluidor FLG a 5°C, observou-se uma redução na produção de L-lactato, acompanhada pela queda de captação do oxigênio, bem como do conteúdo de ATP. Estas observações indicaram ser a glicólise (frutólise) a fonte primária de energia espermática do sêmen a 5°C. Em contrapartida, os espermatozoides armazenados no mesmo diluidor a 16°C, utilizaram, como fonte primária de energia, a respiração mitocondrial aeróbica. Estas diferenças no metabolismo energético, observadas durante o armazenamento do sêmen a 5° ou 16°C, indicam que os espermatozoides podem modular diretamente o consumo de substratos energéticos em resposta a diferentes condições do ambiente em que se encontram.

2.4.9. Influência do período de armazenamento do sêmen de varrões

O ponto crítico de estocagem do sêmen do varrão é o fato de sua capacidade fecundante diminuir após 24 horas ou mais de armazenamento (Polge, 1956a). Além disso, tem sido observado que a percentagem de porcas com gestação positiva, bem como o tamanho da leitegada, diminuiu marcadamente com o aumento do

tempo transcorrido entre a coleta e a IA (Ito *et al.*, 1948). Observou-se, ainda, uma redução acentuada no número de porcas que se tornaram gestantes, quando as mesmas foram inseminadas com sêmen armazenado por 24 horas ou mais, embora tenha havido apenas uma pequena redução no tamanho da leitegada (Polge, 1956b).

Dziuk e Henshaw (1958) observaram maiores taxas de gestação nas fêmeas inseminadas com sêmen armazenado por três dias em comparação às inseminadas com sêmen armazenado por dois dias, quando o sêmen foi mantido a 7°C. Esta diferença se deve, provavelmente, à adição de antibióticos à fórmula do diluidor (penicilina e estreptomicina). O número de fetos e a mortalidade embrionária nas fêmeas inseminadas com sêmen fresco ou armazenado por um dia se manteve dentro da média observada quando utiliza-se a monta natural, embora fosse maior naquelas inseminadas com sêmen armazenado por três dias. Estas diferenças indicam que os espermatozoides armazenados por mais de três dias, antes da IA, produzem zigotos mais susceptíveis à mortalidade precoce. Salisbury *et al.* (1952) descreveram o mesmo fenômeno em bovinos.

Em contrapartida, no estudo de Alexopoulos e colaboradores (1996) foram usadas doses de sêmen diluído em BTS e contendo 1×10^9 (A), 3×10^9 (B) ou 5×10^9 de espermatozoides (C). O sêmen foi armazenado a 17°C por no máximo 120 horas, sendo avaliado a cada 24 horas. Houve queda significativa ($p < 0,05$) da motilidade, a partir de 48 horas de armazenamento, para todas as concentrações utilizadas. Além disso, não observou-se diferenças entre as doses A e B, porém, nas doses contendo 5×10^9 observou-se uma maior ($p < 0,05$) queda da motilidade. Isto pode decorrer do pobre ambiente metabólico disponível para os espermatozoides. No entanto, é importante ressaltar que as doses C continham, no geral, maior número de espermatozoides

vivos, mesmo após 120 horas de armazenamento. Desta forma, a expectativa era de se obter altas taxas de fertilidade após IA's com doses de 5×10^9 , mesmo armazenadas por 96 a 120 horas. A taxa de retorno ao estro, nas porcas inseminadas com 1×10^9 ou 3×10^9 , foram maiores ($p < 0,05$) para o sêmen armazenado por 96 a 120 horas. Em contrapartida, quando foram utilizadas doses com 5×10^9 houve aumento significativo ($p < 0,05$) das taxas de retorno para as IA's realizadas com sêmen armazenado por mais de 48 horas. As taxas de parto também foram menores para as doses de 5×10^9 , armazenadas por 48 horas ou mais. Observou-se, ainda, uma redução do tamanho da leitegada quando as porcas foram inseminadas com doses armazenadas por 96 a 120 horas.

Diferentemente, Johnson *et al.* (1988) obtiveram altas taxas de fertilidade no quarto dia após a coleta de sêmen e diluição em BTS, quando o número de espermatozoides passou de 3×10^9 para 6×10^9 . Estes resultados foram posteriormente confirmados por Machaty *et al.* (1992), quando utilizaram doses de sêmen de $2,5 \times 10^9$ espermatozoides no dia zero da IA e de 5×10^9 no dia 4, e obtiveram taxas de parição similares ($p > 0,05$).

Em um estudo envolvendo porcas inseminadas com doses de 3×10^9 de espermatozoides, à intervalo de 0-72 horas após a coleta e diluição ou com 6×10^9 quando o período de estocagem foi superior a 72 horas, não observou-se efeito do período de incubação sobre o tamanho da leitegada. Embora um tratamento contendo doses inseminantes de 3×10^9 , armazenadas por mais de 72 horas, não tenha sido incluído no delineamento experimental, aceita-se, comumente, que os parâmetros de qualidade seminal e de fertilidade do sêmen fresco diminuem com o aumento do período de estocagem (Flowers, 2002).

Visando-se investigar a qualidade do sêmen diluído de varrões durante o

armazenamento, de forma a determinar o melhor diluidor a ser utilizado, bem como a duração da viabilidade espermática do sêmen resfriado, Huo *et al.* (2002) diluíram o sêmen em BTS[®], Androhep[®], Zorlesco[®] ou Kiev[®], armazenando-o a 17°C, por até 15 dias. A gentamicina (300mg/L) foi adicionada aos quatro diluidores. Observou-se, neste experimento, diferenças quanto à manutenção da viabilidade espermática, atividade mitocondrial, integridade do acrossoma e na capacitação espermática. A ordem de classificação quanto à manutenção da viabilidade espermática e atividade mitocondrial foi Androhep[®], Zorlesco[®], BTS[®] e Kiev[®]. No entanto, o percentual de acrossomas intactos no sêmen diluído com BTS[®], Zorlesco[®] e Androhep[®] foi similar, embora maior que o encontrado nos espermatozoides diluídos no Kiev[®]. Houve menos de 15% de espermatozoides capacitados no sêmen diluído em BTS[®], Androhep[®] e Zorlesco[®] durante nove dias de armazenamento, embora aos 13 dias esta percentagem tenha subido para 85%. Para o Androhep[®], encontrou-se acima de 70% de espermatozoides viáveis aos nove dias de armazenamento.

Apesar do BTS[®] ser um diluidor simples de curta duração, a sua baixa concentração de potássio pode manter as concentrações intracelulares de potássio dentro de padrões fisiológicos adequados, quando comparado a outros diluidores. Além disso, os diluidores Androhep[®] e Zorlesco[®] têm em sua composição a BSA, que dentre outras, tem a função de proteção da membrana.

Uma taxa de gestação aceitável tem sido reportada com o sêmen diluído em Androhep[®] e exposto a 12°C por mais de 60 horas. Além disso, não observou-se diferenças nas taxas de parto, nascidos totais e nascidos vivos para o sêmen armazenado a 12°C ou a 17°C (Althouse *et al.*, 1998).

Mudanças estruturais e funcionais dos espermatozoides, relacionadas com o

armazenamento do sêmen resfriado, lembram o processo de envelhecimento natural, podendo ser causadas pelas condições e tempo de estocagem. O envelhecimento dos espermatozoides ocorre durante o armazenamento *in vitro* e após a IA *in vivo*, quando populações de espermatozoides férteis aguardam a ovulação. Isto significa que o sucesso da fertilização é influenciado por dois períodos de envelhecimento: o armazenamento *in vitro* por período superior a cinco dias, bem como o envelhecimento *in vivo*, que aumenta quando o intervalo entre a IA e a ovulação é superior a 12-24 horas (Waberski *et al.*, 1994b; Soede *et al.*; 1995a).

Leitoas inseminadas dentro de um intervalo de 24-30 horas pré-ovulação, com sêmen armazenado por 96-120 horas apresentaram uma redução de 6,7 embriões ($p < 0,05$) quando comparadas às leitoas inseminadas, no mesmo intervalo, porém com sêmen armazenado por no máximo 48 horas. Esta redução no número de embriões demonstra o efeito do envelhecimento *in vitro* e *in vivo* das células espermáticas (Bennemann *et al.*, 2005).

2.5. Endocrinologia da fêmea suína

A produtividade das matrizes suínas dentro de um sistema de produção está diretamente relacionada ao número de leitões desmamados por porca ao ano, uma função do número de leitões nascidos por leitegada e do número de partos/porca a cada ano. O número de partos por porca ao ano, por sua vez, está relacionado ao intervalo entre partos (IEP), sendo a produtividade considerada ótima quando este intervalo é de 140-150 dias. Normalmente, não há ocorrência de cio em porcas durante a lactação, desta forma, a duração da lactação e o intervalo entre a desmama e o início do

cio (IDC) determinam a máxima produtividade (Cox e Britt, 1982a).

A reprodução em suínos é um processo bastante excepcional no sentido de que a porca ovula entre 15 e 30 oócitos, durante um ciclo estral, sendo que a taxa de ovulação e a qualidade destes oócitos ovulados irá depender do processo de desenvolvimento folicular em período prévio (Soede *et al.*, 2011).

Leitoas normalmente chegam à puberdade aos 150 a 220 dias de idade, dependendo de muitos fatores, incluindo o tempo de contato diário com o varrão e a condição corporal das mesmas. Após a puberdade, a maioria das leitoas são inseminadas durante o segundo ou terceiro cio. Havendo sucesso nas inseminações, uma gestação de 114 a 116 dias de duração se seguirá e, em seguida, uma lactação, que poderá variar de 16 a 40 dias, de acordo com o sistema de produção e a legislação vigente. As porcas normalmente apresentam anestro lactacional, que é então seguido por um intervalo da desmama ao cio (IDC) praticamente fixo de 4 a 6 dias (Soede *et al.*, 2011).

Estes estágios reprodutivos são controlados por um sistema de “feedbacks” positivos e negativos de hormônios reprodutivos que são produzidos e liberados do hipotálamo (GnRH – Gonadotrophin releasing hormone), da hipófise (FSH – Follicle stimulating hormone; LH – Luteinizing hormone; oxitocina e prolactina), dos ovários (progesterona, 17β estradiol, inibina e relaxina) e do útero (PGF-2 α) (Soede *et al.*, 2011).

Assim, pode-se concluir que a porca é uma fêmea poliestral com múltiplas ovulações. A duração dos ciclos estrais varia de 18 a 24 dias, com média de 21 dias. A duração do cio também é variável, indo de 12 a 72 horas; no entanto, a maioria das fêmeas têm cio com duração de 48 a 56 horas. Sabe-se que a ovulação ocorre quando transcorridos 70% do cio, no entanto, devido à alta

variação na duração do mesmo, a previsão do momento em que ocorrerá a ovulação se torna difícil (Foxcroft *et al.*, 2000). As ovulações são espontâneas e de caráter múltiplo (10 a 24 folículos, com 15 a 30 oócitos ovulados), começando aproximadamente 36 a 44 horas após o início do cio e durando 3,8 horas (Falceto *et al.*, 2010).

2.5.1. Período pós-parto

Durante a lactação, as concentrações e a pulsatilidade do LH são inibidos devido à supressão das ondas de liberação de GnRH (De Rensis *et al.*, 1993). O grau de supressão do LH está relacionado não apenas à intensidade das mamadas pelos leitões mas também ao balanço energético negativo das fêmeas. Os efeitos da lactação no FSH são menos consistentes e se devem, primariamente, ao *feedback* negativo da inibina, produzida pelos folículos antrais de crescimento limitado.

Durante as últimas décadas, vários avanços tecnológicos permitiram o estudo de alterações endócrinas relacionadas ao desenvolvimento folicular na porca. Antes da introdução da ultrassonografia transretal por Soede *et al.* (1992), somente era possível estudar o desenvolvimento folicular na porca através do exame morfológico dos ovários realizado após abate (Holness e Hunter, 1975; Dalin, 1987) ou através de exames laparoscópicos (Holness e Hunter, 1975; Kunavongkrit *et al.*, 1983).

Os dados descritos por Varley e Foxcroft (1990) sugeriram que, em porcas lactantes, o crescimento folicular pode ser acelerado por aumentos na secreção episódica de LH na presença de concentrações adequadas de FSH. A redução do efeito inibitório da amamentação e/ou lactação pode estimular mudanças hormonais que levam ao crescimento folicular. A ultrassonografia

realizada sistematicamente pode correlacionar o crescimento folicular com os níveis plasmáticos de gonadotrofinas, hormônios esteróides, inibina e outros hormônios. Desta forma, tem sido possível um melhor entendimento sobre os mecanismos que possibilitam uma redução do IDC pelo desmame parcial (Zak *et al.*, 2000); da indução do cio lactacional pela mamada intermitente (Gerritsen *et al.*, 2008) ou sobre os efeitos da alimentação na liberação de hormônios (Kauffold *et al.*, 2008).

Com exceção de cios anovulatórios que podem ocorrer em algumas porcas nos primeiros dias pós parto (Baker *et al.*, 1953), normalmente as porcas domésticas permanecem em anestro durante as primeiras 4-6 semanas de lactação (Britt *et al.*, 1985). Acredita-se que este cio anovulatório pós-parto seja resultado das altas concentrações de estrógenos circulantes na porca antes do parto (Gordon, 1997).

A lactação representa um período produtivo, onde existem poucas chances de se iniciar uma nova gestação (Varley e Foxcroft, 1990). Trata-se de um período curto, embora a expectativa seja que as matrizes em reprodução produzam leitegadas numerosas, sejam capazes de nutrir adequadamente estas leitegadas durante a lactação de 3-4 semanas, e ao final, entre em cio e ovule dentro de cinco dias após o desmame (Varley e Foxcroft, 1990).

Nos primeiros 7-10 dias após o parto ocorrem a involução uterina e a reparação endometrial. Evidências sugerem que o útero se torna rapidamente capaz de sustentar outra gestação (Hughes e Varley, 1980). No entanto, durante o período inicial da lactação os ovários estão quiescentes até aproximadamente 10 dias. Após este período, folículos pequenos (2-3mm) começam a se desenvolver, embora nenhum

deles alcance a dominância (9-10mm) (Britt *et al.*, 1985).

No decorrer da lactação a pulsatilidade do LH é restaurada, o que pode estar relacionado à redução na frequência de mamadas e/ou ao aumento da responsividade do LH hipofisário ao GnRH. Concomitantemente ao aumento da pulsatilidade do LH, o diâmetro folicular aumenta no transcorrer da lactação. Assim, os folículos aumentam de diâmetro apesar de não ultrapassarem 3-4 mm. Ao final da lactação a maioria das porcas aparentam ter ondas sincronizadas de desenvolvimento folicular, com folículos chegando a 4-5 mm de diâmetro e regredindo em seguida (Soede *et al.*, 2011).

Pouco se sabe a respeito da distribuição de folículos de diferentes tamanhos durante a lactação. Antes da desmama a maioria dos folículos tem menos de 5 mm de diâmetro. Entretanto, a desmama resulta em crescimento imediato dos folículos para mais de 8 mm (Warnick *et al.*, 1950; Britt *et al.*, 1985). O número de folículos antrais não muda durante a lactação, embora ocorra aumento gradual do seu tamanho, que se torna acentuado após a quinta semana de lactação. Em contrapartida, a percentagem de folículos atrésicos declina no decorrer da lactação, parecendo haver uma relação inversa com a percentagem de folículos maiores (Britt *et al.*, 1985).

O crescimento folicular durante e após a lactação depende da secreção de gonadotrofinas pela hipófise. Sabe-se que a inibição do LH e do FSH na lactação se estabelece entre 24 e 48 horas após o parto (Sesti e Britt, 1994). No entanto, entre 3-4 dias após o parto há um breve período hipergonadotrófico devido à súbita remoção do efeito *feedback* negativo da progesterona e dos estrógenos feto-placentários sobre o eixo hipotálamo-hipofisário (Britt *et al.*, 1985).

Kunavongkrit (1984) observou maiores concentrações de LH durante a lactação em

porcas amamentando pequenas leitegadas (2-4 leitões) do que em porcas amamentando leitegadas de 7 a 12 leitões. Bevers *et al.* (1981) demonstraram que a resposta da hipófise à aplicação de 25 µg de GnRH sintético liberando LH aumentou da primeira para a segunda semana de lactação, sendo esta resposta independente da presença dos leitões, mesmo sob concentrações de prolactina sete vezes maiores.

A capacidade do estradiol em estimular os pulsos de LH parece mudar durante a lactação. Quando Elsaesser e Parvizi (1980) desafiaram porcas com benzoato de estradiol (60µg/kg) no dia 5 da lactação, não houve evidência de um pico pré ovulatório de LH. No entanto, quando este tratamento foi feito aos 35 dias de lactação, observou-se aumento nas concentrações de LH, entre 48 e 72 horas após a aplicação, sendo que quatro de nove porcas tratadas ovularam.

De acordo com Sesti e Britt (1994), as concentrações circulantes de LH começam a declinar com 24 horas após o parto, continuam caindo até 30 horas e, permanecem baixas durante a primeira semana de lactação. Os autores sugeriram ainda que os sinais neuronais oriundos do estímulo físico nas glândulas mamárias das porcas são a primeira razão para a inibição da secreção de gonadotropinas durante a lactação.

Muitos hormônios estão envolvidos no estabelecimento e na manutenção da lactação. A prolactina e a oxitocina são os fatores lactogênicos principais, embora os hormônios do crescimento, tiroideanos e adrenais estejam, também, envolvidos (Varley e Foxcroft, 1990).

As concentrações plasmáticas de LH e de prolactina estão, geralmente, inversamente relacionadas na porca em lactação (Dusza e Tilton, 1990). Provavelmente, isto se deva aos efeitos inibitórios da amamentação em

neurônios dopaminérgicos e nos produtores de GnRH (Foxcroft, 1992).

Grande número de estudos tem demonstrado que os peptídeos opióides endógenos (POE) estão envolvidos no controle da secreção de LH, FSH e prolactina durante a lactação. Assim, a injeção (Barb *et al.*, 1986) ou infusão (Armstrong *et al.*, 1988) de naloxone, um antagonista dos POE aumentou a secreção de LH em porcas lactantes. O efeito estimulante da amamentação na secreção de prolactina é mediado pela inibição de neurônios dopaminérgicos. Assim, o tratamento de porcas com bromocriptina, um agonista dopaminérgico, inibiu de forma efetiva a secreção de prolactina no início e no final da lactação (Bever *et al.*, 1981; Mattioli e Seren, 1985, citados por Foxcroft, 1992). O aumento de intensidade da mamada durante os primeiros dias pós parto, provoca redução gradual das concentrações basais de FSH e LH acompanhados por redução no tamanho dos folículos (Palmer *et al.*, 1965a,b; Sesti e Britt, 1994).

A segunda semana de lactação pode ser considerada como um período de transição para a porca. 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. As concentrações de LH na hipófise são maiores aos 28 dias de lactação do que aos 14 dias, sendo que as concentrações de FSH tendem a aumentar da metade para o final da lactação (Sesti e Britt, 1993).

No decorrer da lactação, o hipotálamo deixa de sofrer, gradualmente, os efeitos inibitórios exercidos pelos POE liberados em decorrência das mamadas. Além disso, há aumento nas concentrações plasmáticas de LH e FSH após a terceira semana de lactação (Stevenson e Britt, 1980). Estes fatos são atribuídos principalmente à

redução da intensidade das mamadas no decorrer da lactação (Varley e Foxcroft, 1990).

Desta forma, durante a terceira semana de lactação há aumento gradual da secreção pulsátil de GnRH e gonadotropinas (Stevenson e Britt, 1980), assim como do número e do tamanho dos folículos presentes nos ovários (Palmer *et al.*, 1965a; Kunavongkrit *et al.*, 1982; Sesti e Britt, 1993).

Lucy *et al.* (1999) descreveram quatro padrões de crescimento folicular durante a lactação, sendo estes padrões observados utilizando ultrassonografia. Os dois primeiros padrões de desenvolvimento folicular envolveram a ovulação e a formação de folículos císticos, antes da desmama. O terceiro padrão foi representado pela inatividade ovariana, caracterizada por folículos extremamente pequenos (<2mm de diâmetro). Finalmente, o quarto padrão descrito foi o de ondas de crescimento folicular sincronizadas prévias à desmama. Estas ondas são formadas por 20-30 folículos que crescem de 2mm até 4-6mm, e se tornam co-dominantes. Estes folículos co-dominantes regridem e são substituídos por uma nova onda. De acordo com este padrão de crescimento, o intervalo da desmama ao cio (IDC) irá depender do estágio de desenvolvimento folicular de um grupo de folículos no momento da desmama. Ou seja, porcas desmamadas durante o desenvolvimento de um grupo de folículos irão retornar ao cio rapidamente, enquanto aquelas desmamadas durante a regressão de uma onda folicular apresentarão um maior intervalo desmama cio.

Após o parto, há uma mudança no metabolismo corpóreo, que passa de um estado anabólico durante a gestação para um estado catabólico durante a lactação, dando à glândula mamária prioridade sobre os demais tecidos (Collier *et al.*, 1984).

Frequentemente, a ingestão de alimentos não é suficiente para compensar a produção de leite havendo mobilização das reservas corporais de gordura e proteína, resultando no estabelecimento de um balanço energético negativo durante a lactação (Quesnel e Prunier, 1995; Mejia-Guadarrama *et al.*, 2002). O pico de produção de leite nas porcas ocorre com aproximadamente 2-3 semanas pós-parto (Toner *et al.* 1996). Este período coincide com a idade de desmama em criações comerciais, que é de 3 a 5 semanas, período no qual as fêmeas se encontram em anestro lactacional (Quesnel e Prunier, 1995), havendo retorno ao estro dentro de 3 a 7 dias pós-desmama (Britt, 1986).

Os suínos representam um bom modelo para estudar a interação existente entre a nutrição e a reprodução (Cosgrove e Foxcroft, 1996). O catabolismo tissular durante a lactação reforça, invariavelmente, a supressão induzida pela amamentação na secreção de LH, principalmente em porcas de primeiro parto. A relação entre as concentrações de insulina, a secreção de LH e a fertilidade pós desmama está bem estabelecida nesta espécie. Cosgrove e Foxcroft (1996) observaram que limitadas reservas corporais de gordura associadas à alta demanda energética para a produção de leite e crescimento corporal, são provavelmente os principais fatores relacionados com a redução da fertilidade após a desmama em primíparas.

No entanto, Quesnel e Prunier (1995) concluíram que a inibição do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal durante a lactação na porca se deve, principalmente, aos reflexos neuroendócrinos induzidos pela amamentação, de forma que as condições nutricionais se tornam relativamente mais importantes durante a terceira e quarta semanas após o parto.

A supressão da liberação de LH durante a lactação influencia tanto o desenvolvimento folicular lactacional quanto a retomada da

atividade ovariana após a desmama (Quesnel *et al.*, 1998). Além disso, os mecanismos de *feedback* positivo do estradiol nos picos de LH amadurecem no transcorrer da lactação, aumentando a capacidade das porcas em estabelecer um pico pré-ovulatório de LH de magnitude suficiente (Sesti e Britt, 1993b). Estes mecanismos juntos formam a base do efeito da lactação nas variáveis de fertilidade subsequentes, tais como: intervalo desmame-cio (IDC), taxa de ovulação e até mesmo sobrevivência embrionária, que afetará por sua vez a taxa de parição e tamanho da leitegada (Soede *et al.*, 2011).

2.5.2. Período pós desmame

A fase folicular do ciclo estral da porca dura 4-6 dias e ocorre após a fase luteal ou após a lactação. No início da fase folicular ou, possivelmente, ao final da fase pré-folicular, dependendo das concentrações periféricas de progesterona (fase luteal) ou dos efeitos inibitórios da lactação (dias após o parto, balanço energético negativo e intensidade das mamadas) os maiores folículos antrais do “pool” (normalmente com 2-4 mm) são recrutados e começam a se desenvolver. Os folículos que são recrutados podem ainda sofrer atresia durante a fase folicular, mas uma vez selecionados, escapam da atresia e eventualmente ovulam com um diâmetro de 7-9 mm (Soede *et al.*, 2011).

O “pool” de folículos antrais que estão presentes no começo da fase folicular se desenvolveu durante o final da fase luteal do ciclo estral ou durante a lactação, e pode conter na média até 100 folículos, com diâmetros de até 6 mm (Soede *et al.*, 2011).

O recrutamento de folículos ocorre quando a liberação pulsátil de GnRH/LH muda de um padrão de menor frequência/menor amplitude para um de maior frequência/menor amplitude. Esta mudança

no padrão de liberação do LH tem sido estabelecida tanto para porcas desmamadas quanto para fêmeas ao início do ciclo estral. No entanto, para porcas desmamadas, a frequência dos pulsos de LH tanto antes quanto depois da desmama é comprometido em porcas com severo balanço energético negativo durante a lactação, o que resulta em prolongamento do IDC (Soede *et al.*, 2011).

Mudanças na secreção de FSH, LH, prolactina e hormônios esteróides no cio pós-desmame em porcas têm sido vastamente estudadas (Ash e Heap, 1975; Stevenson e Britt, 1986; Stevenson *et al.*, 1981; Edwards e Foxcroft, 1983). Entretanto, poucas informações precisas estão disponíveis sobre as mudanças endócrinas precisas que ocorrem com a retirada dos leitões.

Aherne *et al.* (1976) e Edwards e Foxcroft (1983) demonstraram que as concentrações periféricas de FSH aumentam com a desmama. Outros estudos demonstraram, também, um aumento na secreção de LH acompanhando a desmama.

Shaw e Foxcroft (1985) afirmaram que a desmama resulta em mudanças dramáticas na secreção hormonal, mudanças estas que também são influenciadas pela duração da lactação. Com 8-12 horas após a desmama, as concentrações plasmáticas de LH aumentam, havendo aumento na frequência dos pulsos de LH durante os próximos 2-3 dias (Cox e Britt, 1982b; Shaw e Foxcroft, 1985). As concentrações de FSH geralmente aumentam após a desmama (Cox e Britt, 1982a; Shaw e Foxcroft, 1985); no entanto, este aumento não é tão acentuado quanto o observado para o LH.

Este aumento na secreção de FSH e LH pode ser explicado pela súbita remoção dos efeitos inibitórios impostos pela amamentação (Shaw e Foxcroft, 1985). De acordo com Einarsson *et al.* (1998), a remoção do estímulo da mamada causa um decréscimo imediato da secreção de

prolactina, seguido por aumento da secreção de gonadotrofinas, do crescimento folicular e também das concentrações plasmáticas de 17β -estradiol. Tais eventos culminam com a indução do estro, do pico pré-ovulatório de GnRH/LH e conseqüentemente, da ovulação.

O FSH é importante para aumentar o número de folículos que chegam a médios ou grandes (recrutamento) e o LH é necessário para continuar o crescimento destes folículos até o tamanho pré-ovulatório (seleção) (Kemp *et al.*, 1998; Knox, 2005). Uma vez que o LH tenha estimulado o desenvolvimento de folículos maiores que contenham número suficiente de receptores de LH, estes folículos começarão a produzir 17β -estradiol. O 17β -estradiol, por sua vez, tem efeito *feedback* negativo no hipotálamo, resultando em redução da liberação de GnRH, com subsequente redução na liberação do LH e do FSH. Como os folículos menores possuem poucos receptores de LH, sendo dependentes do FSH, estes sofrem atresia. Assim, o restante da fase folicular é caracterizada por um aumento no desenvolvimento de folículos maiores, LH-dependentes. Além do LH e do FSH, também o sistema IGF-1 tem importante papel na seleção e no desenvolvimento de folículos saudáveis até a ovulação (Soede *et al.*, 2011).

2.5.3. Intervalo desmame-cio

As fêmeas suínas demonstram estro, normalmente, 4-6 dias após o desmame, sendo que intervalos superiores a 10 dias são considerados problemáticos (Killen *et al.*, 1992).

Poleze (2004) afirmou que 85 a 90% das fêmeas manifestaram cio dentro de oito dias após a desmama, embora diversos fatores possam interferir na duração do intervalo desmama-cio ou IDC.

O crescimento folicular insuficiente coincidente com o anestro prolongado no pós parto, é um fator proeminente que contribui para a ineficiência econômica na produção de suínos, por aumentar os dias não produtivos das matrizes (Maurer *et al.*, 1985). As gonadotrofinas, FSH e LH, são os estímulos primários para a foliculogênese e expressão do cio após o desmame (Britt *et al.*, 1985; Varley e Foxcroft, 1990). No entanto, mudanças na secreção de FSH, LH ou prolactina não explicam, totalmente, a variabilidade de desenvolvimento folicular em porcas, 48 horas após o desmame (Foxcroft *et al.*, 1987).

Edwards e Foxcroft (1983), no entanto, afirmaram que a concentração média de LH, 12 horas antes da desmama, foi inversamente relacionada com o IDC, indicando que os eventos que ocorrem durante a lactação podem determinar a resposta da porca à desmama. Uma vez que o período de latência entre a ativação do mecanismo de *feedback* positivo do estradiol e o pico pré-ovulatório de LH na porca é de 50-55 horas, a relação temporal entre a desmama e o cio sugere que alguns animais secretam estradiol no momento da desmama. Com relação ao FSH, as concentrações antes e depois da desmama não tem relação com o IDC (Shaw e Foxcroft, 1985).

Imediatamente após a desmama, a liberação de LH normalmente aumenta, sendo caracterizada por pulsos de baixa amplitude e alta frequência. A função destes pulsos de alta frequência é estimular o crescimento folicular, resultando em reduzido IDC (Shaw e Foxcroft, 1985; Van de Brand, 2000).

Com a desmama, espera-se que ocorra um rápido desenvolvimento folicular que culmine em cio e ovulação. Um longo intervalo de tempo entre a desmama e a ovulação resulta não apenas em aumento do intervalo entre partos, mas também no

aumento da porcentagem de porcas que repetem cio. Salienta-se, além disso, a redução observada no tamanho das leitegadas. Assim, porcas inseminadas seis a nove dias após o desmame apresentaram leitegadas menores que as inseminadas mais cedo (Dewey *et al.*, 1994; Vesseur *et al.*, 1994). Clowes *et al.* (1994) observaram um aumento do tamanho da leitegada em porcas de primeira e segunda ordens de parição, inseminadas em seu segundo cio pós desmama.

Com o progresso da suinocultura, o IDC vem diminuindo ao longo dos anos. Na década de 80, era de 11,5 a 20,5 dias (Vesseur, 1997). No início da década de 90, passou para 7 a 9 dias (Wilson e Dewey, 1993), e no final da década, para 6 a 8 dias (Koutsothodoros *et al.*, 1998). Atualmente, o IDC está entre 4 e 6 dias na maioria das granjas tecnificadas (Vesseur, 1997; Kummer *et al.*, 2003). Fatores como alterações na seleção genética, aumento da heterose, mudanças nutricionais, sistemas de alojamento e a utilização de hormônios indutores do estro, contribuíram para a redução do IDC (Vesseur, 1997).

No entanto, não se deve diminuir o IDC indefinidamente, porque existe um período ótimo de dias entre o desmame e o cio que maximiza a produtividade da fêmea suína. Um IDC inferior a três dias pode levar a uma redução do número de leitões nascidos vivos no parto seguinte, bem como da taxa de parição. O IDC que possibilita a máxima produtividade das matrizes suínas situa-se entre 3-7 dias (Steverink *et al.*, 1999).

Muitos fatores influenciam a retomada da atividade ovariana na porca após a desmama, dentre eles a duração da lactação, ordem de parto, nutrição, frequência de exposição ao macho, tamanho da leitegada, genética, estação do ano, manejo, além de intoxicação por micotoxinas e outras doenças (Dial *et al.*, 1992; Einarsson *et al.*, 1998).

2.5.3.1 Fatores que afetam o intervalo desmame-cio (IDC)

2.5.3.1.1 Exposição ao macho

Tem sido frequentemente demonstrado que a exposição de leitoas pré-púberes a um varrão adulto maduro reduz a idade com a qual estas fêmeas chegarão à puberdade (Kemp *et al.*, 2005). Além disso, estudos demonstram que a exposição diária ao macho resulta na redução do IDC e no aumento da percentagem de porcas em cio até 10-16 dias após a desmama.

Hughes (1990) não encontrou efeito do contato com o varrão uma ou três vezes por dia após a desmama no IDC da maior parte das porcas pluríparas utilizadas no experimento.

O estímulo do varrão pode ser de particular importância para porcas com IDC longo, como, por exemplo, primíparas. Langendijk *et al.* (2000) realizaram um experimento para validar os efeitos do contato do macho após a desmama, no IDC de 94 primíparas. De acordo com os autores, o contato resultou em aumento da percentagem de porcas que ovularam até nove dias após a desmama (51 vs 30%, $p < 0,05$), no grupo submetido à exposição ao macho em comparação ao grupo sem exposição.

A exposição precoce ao macho, logo após a desmama, pode ser mais eficiente para estimular o cio. Walton (1986) expôs porcas durante a última semana de lactação ao contato com o varrão, duas vezes ao dia durante 30 minutos, e observou redução do IDC. Newton *et al.* (1987) afirmaram que a exposição de porcas lactantes ao varrão, uma vez ao dia por uma hora, durante os 8 dias finais da lactação, resultou em uma redução do IDC em 0,9 dias. Petchey e English (1980) alojaram porcas em lactação em dois lotes coletivos a partir da terceira semana de lactação. Um dos lotes foi

exposto ao varrão e apresentou IDC de 4,7 dias, sendo o IDC do lote sem exposição de 10 dias. No entanto, a introdução do estímulo do macho durante a lactação pode resultar em cio lactacional.

Em contrapartida, Knox *et al.* (2002) afirmam que o aumento da frequência de exposição ao macho, de uma para duas ou três vezes ao dia, não aumentou as taxas de retorno ao cio, não reduziu o IDC, nem alterou o momento da ovulação após o início do cio. A não redução do IDC com o aumento da frequência de exposição ao macho sugere que quando as rufiações começam três dias após a desmama, não há vantagem em aumentar sua frequência. Os autores sugerem ainda que houve uma redução suave, porém significativa, na manifestação do estro no grupo de fêmeas expostas ao macho duas vezes ao dia, o mesmo observando-se nas fêmeas expostas três vezes ao dia em comparação às expostas duas vezes. Ainda não existe uma explicação plausível para estas observações. Entretanto, a utilização de exames ultrassonográficos indica que este fato está relacionado ao aumento da proporção de anormalidades ovarianas e de estro. O aumento da ocorrência destas anormalidades, acompanhando o aumento da frequência de exposição ao macho não é ainda bem compreendido. Sugere-se, entretanto, que o contato com o varrão leve a um aumento do LH e da prolactina em leitoas (Prunier *et al.*, 1987), bem como em porcas desmamadas (Newton *et al.*, 1987).

Se a exposição ao macho induz mudanças endócrinas a nível hipofisário, mudanças ovarianas também podem ser esperadas. A explicação mais aceita para os efeitos deletérios do aumento do contato com o macho, sobre a manifestação do cio, envolve a possibilidade de que as fêmeas se habituem ao estímulo.

Hemsworth e Hansen (1990) afirmaram que o contato com o macho tem sido associado

a uma redução da duração do cio, bem como a baixas taxas de manifestação.

Na prática, o momento da inseminação é baseado nos sintomas de cio das porcas. Os sintomas mais comumente usados são o reflexo de tolerância ao macho (RTM) e o reflexo de tolerância ao homem (RTH). É indiscutível que o estímulo do macho tem efeito substancial na expressão do cio em porcas (Soede *et al.*, 1996).

Willemse e Boender (1966, 1967) afirmaram que apesar da duração do cio ser variável, o período de tempo durante o qual cada animal mostra RTM e RTH positivos são altamente correlacionados. Entretanto, de acordo com Soede *et al.* (1996) a manifestação de RT ao varrão e ao homem não possui alta correlação. Assim, em quase 20% das porcas o RTH durou menos de 24 horas, o que limita a detecção do cio. Além disso, o momento da ovulação em relação ao início do cio, baseando-se apenas no RTH foi mais variado do que o momento da ovulação em relação ao início do RTM. Desta forma, conclui-se que a detecção do cio com varrões foi mais precisa quanto à predição do momento da ovulação. De acordo com os autores, apenas 60% das fêmeas em cio apresentaram RTH na ausência do varrão. No entanto, quando houve a introdução do macho esta proporção aumentou para 100%.

A função estimuladora do varrão na manifestação do cio pós desmame pode ser explicada pelo aumento da liberação de LH pela hipófise. Substâncias captadas pelo olfato e relacionadas à presença do varrão; os chamados ferormônios, liberados das glândulas submaxilares, ativam o sistema nervoso central para que o mesmo libere neuropeptídeos e hormônios envolvidos no controle da pulsatilidade do LH (Kemp *et al.*, 2005). Parece que porcas produzindo LH suficiente após a desmama têm um crescimento folicular contínuo e, conseqüentemente, reduzido IDC. Nestas porcas (IDC < 6,5 dias), não há efeito

aditivo do aumento da frequência de exposição ao varrão. Entretanto, para aquelas fêmeas com menor liberação de LH há benefício associado à maior presença do macho (Kemp *et al.*, 2005).

2.5.3.1.2. Duração da lactação

Alguns dias são necessários para a recuperação do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal-uterino da porca após o parto, que se torna totalmente funcional somente após 2-3 semanas pós-parto (Elsaesser e Parvizi, 1980).

A redução do período lactacional tem sido um procedimento adotado visando melhorar as condições sanitárias dos leitões precocemente desmamados e segregados. Outro objetivo é aumentar a frequência de partos, resultando na maior produção de leitões por porca ao ano (Machado *et al.*, 2000).

No entanto, tem sido observado que uma redução na duração da lactação aumenta o intervalo desmama-cio (IDC) (Xue *et al.*, 1993). Além disso, Machado *et al.* (2000) relataram que a desmama ultra-precocemente (menos de 14 dias de lactação), está associada a uma redução no tamanho da leitegada.

De acordo com Mabry *et al.* (1996) a duração da lactação exerce efeito quadrático sobre o IDC. Quando o seu efeito foi avaliado entre diferentes ordens de parto, o IDC parece ser mínimo nas lactações entre 22 a 27 dias. Entretanto, o IDC foi maior ($p < 0,05$) em lactação inferior a 22 dias ou maior que 27 dias. A média de IDC não foi superior a 7 dias até que a lactação sofresse uma redução para menos que 14 dias.

Knox e Rodrigues-Zaz (2001) observaram que a duração da lactação influenciou dramaticamente o retorno ao estro e a ovulação, em porcas apresentando lactações

menores que 17 dias. Quando a lactação foi curta, houve redução de 60% na manifestação do cio e de 17% na taxa de ovulação. Nas porcas submetidas a desmama precoce e que manifestaram cio, mesmo com desenvolvimento folicular normal, observou-se falha de ovulação.

Koketsu e Dial (1998) afirmaram haver uma interação entre ordem de parto (OP) e duração da lactação com o tamanho da leitegada subsequente ($p=0,004$). Em porcas com OP 1 e 2, não houve diferença no tamanho da leitegada subsequente, para lactações de diferentes durações ($p>0,30$). Em contrapartida, para porcas de OP ≥ 3 observou-se aumento do tamanho da leitegada acompanhando um aumento na duração da lactação para mais de 11 ou 13 dias. Além disso, para lactações com duração entre 14 e 28 dias, as porcas de OP 1 apresentaram leitegadas subsequentes menores do que as de OP 2 e nas de 3 a 6 partos. Não está bem explicado, ainda, porque as porcas mais novas não são afetadas por mudanças na duração da lactação (Walker *et al.*, 1979). Possivelmente, a duração da involução uterina afeta a interação entre OP, duração da lactação e tamanho da leitegada. O endométrio uterino é regenerado entre 14 e 21 dias após o parto (Jainudeen e Hafez, 1993). Pode ser que este processo de reparação do endométrio seja mais rápido em porcas jovens, assim como o é em vacas (Zain *et al.*, 1995).

Self e Grummer (1958), Svajgr *et al.* (1974) e Koketsu *et al.* (1997) também observaram aumento do IDC relacionado à redução na duração da lactação. Além disso, Fahmy (1981) e Koutsotheodoros *et al.* (1998) propõem que essa redução seja observada, principalmente, em lactações com menos de 12 dias.

2.5.3.1.3. Ordem de parto

O intervalo desmame-cio pode ser influenciado pela ordem de parto, sendo que, de modo geral, este é mais longo para as primíparas do que para pluríparas (Wilson e Dewey, 1993).

O maior IDC observado em primíparas quando comparadas às fêmeas com maiores ordens de parição deve-se ao fato da normalização do padrão hormonal ocorrer mais rapidamente nas pluríparas. A necessidade de um maior período de tempo para o restabelecimento da ciclicidade em primíparas resulta da maior sensibilidade destas fêmeas à perda de peso que ocorre durante a lactação. Desta forma, ressalta-se a importância de um manejo alimentar adequado durante esta fase da reprodução (Poleze *et al.*, 2004). Amaral Filha *et al.* (2010), demonstraram que as primíparas possuem maior demanda nutricional, porque ainda não atingiram o tamanho e o peso adultos, além de apresentarem limitadas reservas de proteína e gordura. Possuem, além disso, menor capacidade digestiva, o que interfere na capacidade de ingestão de alimentos durante a lactação.

Guedes e Nogueira (2001) observaram diferença significativa quanto à ingestão diária de ração entre pluríparas e primíparas, sendo maior para as pluríparas (5,72 vs 5,23 kg/dia). As diferenças foram observadas, ainda, no IDC, que foi menor para as pluríparas em relação às primíparas (4,22 vs 5,55 dias, respectivamente). Outros estudos têm observado menores ingestões diárias nas primíparas, que foram de 2,9 kg/dia para Cox *et al.* (1983) e de 3,1 kg/dia para King *et al.* (1984). As demandas energéticas foram maiores para as primíparas (29,3 Mcal/dia), implicando, assim, em uma maior deficiência energética nesta categoria. No estudo de Guedes e Nogueira (2001) observou-se maior perda percentual de espessura de toucinho (4,44%), ao final da gestação em

primíparas. Isto indica que estas fêmeas entram em catabolismo ainda durante a gestação, enquanto as pluríparas permanecem em anabolismo. De acordo com Whittemore *et al.* (1980) e Esbenshade *et al.* (1986) não há correlação entre a percentagem de perda de espessura de toucinho e a de peso corporal total. Desta forma, a perda de peso é usada para representar a perda de gordura, água e proteína, enquanto a redução da espessura de toucinho representa perda de gordura exclusivamente. A depleção dos tecidos corporais é mais importante do que a perda de peso por si só (Cole, 1990). Assim, a função reprodutiva é prejudicada quando há redução na relação lipídio:proteína em primíparas para menos de 1:1 (Whittemore, 1996).

Sterning *et al.* (1990) demonstraram uma correlação positiva significativa entre a perda de peso durante a lactação e o IDC em primíparas, que neste caso foi de 10 dias.

Mabry *et al.* (1996) afirmaram que as fêmeas de primeira ordem de parto (OP) demoraram significativamente ($p < 0,01$) mais tempo para ciclar após a desmama em comparação às porcas mais velhas. Em média, porcas de segunda OP irão ciclar 2,5 dias antes e porcas a partir da terceira OP 3,5 dias antes que as primíparas.

O IDC diminui drasticamente após o segundo parto, permanecendo quase inalterado depois do terceiro parto (Fahmy, 1981).

Maffili *et al.* (2000) avaliaram 9800 registros de coberturas de fêmeas de primeira a décima OP e observaram que as primíparas apresentaram maior IDC (4,94 dias) ($p < 0,05$), sendo nas fêmeas de segunda OP de 4,47 dias. Nas fêmeas com OP entre 3 e 6, o IDC médio foi 4,1 dias, enquanto nas fêmeas com OP acima de seis, observou-se IDC médio de 3,98 dias.

Koketsu e Dial (1998) descreveram uma interação entre a OP e o IDC com o tamanho da leitegada subsequente. Nas porcas de primeira OP, o IDC de 6 a 12 dias resultou em leitegadas menores que nas porcas com IDC de 1 a 5 dias ($p < 0,001$). Com o aumento da OP de 1 para 7, a leitegada subsequente para porcas com IDC entre 6 a 12 dias aumentou em 1,4 leitões. Provavelmente, porcas que conceberam entre 6 a 12 dias após a desmama podem não ter problemas reprodutivos. Entretanto, têm uma menor duração do estro, seguido por coberturas em intervalos irregulares.

O prolongamento no IDC está relacionado com uma pequena ingestão alimentar, lactações curtas e baixas ordens de parto (Koketsu *et al.*, 1996).

2.5.3.1.4. Efeito da genética e da linhagem das fêmeas

Diferenças entre raças e cruzamentos são as principais causas genéticas da variação no IDC (Fahmy, 1981).

Aumaitre *et al.* (1976) foram capazes de demonstrar que os cruzamentos foram responsáveis pela redução no IDC, havendo um efeito significativo da heterose. Ao comparar-se 28 cruzamentos envolvendo 8 raças demonstrou-se diferenças significativas entre os cruzamentos e as raças envolvidas na produção destes cruzamentos, quanto à duração do IDC (Fahmy *et al.*, 1979) (Tabela 6).

Isto significa que as ferramentas genéticas disponíveis podem resultar na modificação do IDC. Entretanto, como esta característica reprodutiva, similarmente à outras, é menos controlada pela ação de genes do que pela influência ambiental, até onde a seleção pode reduzir o IDC é questionável, e se ocorre é de modo lento (Fahmy, 1981).

Atualmente, a política geral é a de se evitar a indução hormonal do cio em muitos

países. Desta forma, a capacidade genética para reduzir o IDC é importante (Rydhmer, 2000).

Ten Napel *et al.* (1995) demonstraram ser possível diminuir o IDC, após o primeiro parto, através da seleção. Segundo os autores a herdabilidade do IDC foi 0,2. Fahmy *et al.* (1979) descreveram que a herdabilidade do IDC foi de 0,25. A herdabilidade do IDC de 10 dias foi estimada em 0,3 (Ten Napel *et al.*, 1998).

Quando leitoas foram selecionadas visando reduzir a idade à puberdade, houve redução associada do IDC (Holder *et al.*, 1993). Sterning *et al.* (1998) demonstraram que a puberdade atrasada está geneticamente relacionada à menor habilidade em demonstrar o cio e ovular dentro de 10 dias após a desmama. Merks e Molendijk (1995) e Hanenberg *et al.* (2001) observaram uma correlação genética positiva entre a idade à primeira cobrição e o intervalo entre desmama e cobrição.

Tem sido sugerido que a natureza da variação genética no intervalo entre a desmama e o início do estro, bem como no IDC está na capacidade das porcas responderem à estímulos apropriados após a desmama. Então, questiona-se quais são os fatores que suprimem esta capacidade que podem ter variação genética, e dois fatores devem ser considerados: a ocorrência destes fatores e a susceptibilidade da porca a eles (Ten Napel *et al.*, 1995). Por exemplo, tanto a ocorrência quanto a susceptibilidade de porcas a perda de peso severa durante a lactação, podem ter componentes genéticos, embora seja muito difícil discriminá-los. A variação genética na ingestão alimentar, espessura de toucinho e tamanho da leitegada podem contribuir para a variação genética na ocorrência de severa perda de peso (Ten Napel *et al.*, 1995).

Tabela 6: Diferenças observadas no IDC entre diferentes raças e seus cruzamentos

Grupos Genéticos	Médias (dias)	Referências
Large White	7,9	Burger (1952)
Large Black	16,1	Burger (1952)
Landrace	9,5	Madean (1968)
Saddleback	11,7	Madean (1968)
Yorkshire	4,3/5,5	Dyck (1972, 1971)
Lacombe	5,2/14,3	Dyck (1972, 1971)
Landrace xYorkshire	10,6	Fahmy e Dufour (1976)
Duroc xYorkshire	18,9	Fahmy e Dufour (1976)
Large Black x Lacombe	13,4	Fahmy e Dufour (1976)
Duroc x Lacombe	13,3	Fahmy e Dufour (1976)
Large Black x Landrace	13,2	Fahmy e Dufour (1976)
Large White x Landrace	3,5	Alkmin (2010)

Fonte: Adaptado de Fahmy (1981)

Quanto da variação genética nos parâmetros biológicos se reflete em variação genética no IDC, sendo completamente dependente

do ambiente, determinado pelo manejo, pela temperatura ambiente, nutrição, ainda precisa ser determinado. Tanto em

ambientes favoráveis quanto desfavoráveis, não serão observadas variações genéticas, porque em um ambiente todos os animais irão ter IDC normal, e em outro todas as porcas entrarão em anestro. Em ambientes intermediários, no entanto, algumas famílias têm maior probabilidade de ter severa perda de peso do que outras, ou talvez sejam mais susceptíveis a fatores estressantes. Isto pode ser observado como variação genética no IDC (Ten Napel *et al.*, 1995).

2.5.4. Duração do estro

De acordo com Weitze *et al.* (1994) e Soede *et al.* (1995a), a duração do estro (DE) em porcas pode variar de 24 até 96 horas, sendo influenciada por fatores tais como ordem de parto, sazonalidade, estresse, efeito do macho e pelo IDC. Este, por sua vez, pode ser influenciado por várias outras características, como discutido acima. A alta variação na DE resulta em uma grande variação no intervalo entre o início do estro e o momento da ovulação.

Até o início dos anos 90, acreditava-se que as porcas ovulavam dentro de um intervalo relativamente fixo após o início do cio, de 38 a 40 horas. No entanto, estudos onde a ovulação foi investigada utilizando ultrassonografia têm demonstrado que as ovulações ocorrem em momentos variáveis após o início do cio. Apesar do intervalo médio até a ovulação não variar muito entre os experimentos (35 a 48 horas), o momento da ovulação em fêmeas suínas, quando considerado individualmente, varia de 10 a 85 horas após o início do cio. Em fêmeas com ovulação espontânea, a duração das ovulações é de apenas 1-3 horas (Soede *et al.*, 1992) ou de no máximo 5 horas, sob condições de estresse (Soede *et al.*, 1997).

O interesse em estudar a DE e sua variação se justifica pela sua relação com o momento da ovulação. Na maioria das porcas, a

ovulação ocorre quando transcorridos dois terços do período de estro. Desta forma, a determinação da DE ajuda no estabelecimento de um protocolo ótimo, envolvendo a utilização da IA (Soede *et al.*, 2011).

Steverink *et al.* (1999) avaliaram 15.186 dados registrados, de 55 granjas comerciais, com o objetivo de estudar os fatores que influenciam a DE, bem como a sua variação dentro da granja e entre granjas. A média geral da DE foi $48,4 \pm 1,0$ horas, com variação de 31 a 64 horas entre granjas. A duração média do cio nas granjas foi consistente em diferentes meses, com repetibilidade de 86%. Em média, as leitoas apresentaram menor DE do que as porcas ($40,8 \pm 1,1$ vs $48,5 \pm 1,0$ horas, $p < 0,01$). Além disso, a duração do primeiro estro após a desmama foi maior ($p < 0,0001$) do que o estro subsequente ($50,2 \pm 1,0$ vs $46,8 \pm 1,0$ horas). Da variação total da DE, 23,3 % foi relacionada ao componente granja. A duração do primeiro cio pós desmame para todas as porcas foi de $50,1 \pm 1,1$ horas. Entretanto, houve uma redução da DE ($p < 0,05$) acompanhando o aumento do IDC, de 4 para 5 dias ($56,0 \pm 1,2$ vs $50,3 \pm 1,1$ horas) e de 5 para 6 dias ($50,3 \pm 1,1$ vs $45,8 \pm 1,2$ horas).

A variação entre granjas quanto à DE pode estar associada às diferenças na interpretação dos sinais de cio, bem como à fatores específicos, tais como o estresse (Soede e Kemp, 1997). Pode advir, ainda, de diferenças na qualidade do varrão utilizado para a detecção do cio (Jongman *et al.*, 1996), da raça e da condição nutricional das leitoas e porcas.

Rojkittikhun *et al.* (1992) e Weitze *et al.* (1994) demonstraram que a duração do estro foi menor na presença de longos IDC's. Além disso, Weitze *et al.* (1994) observaram uma redução do intervalo entre o início do cio e a ovulação, acompanhando o aumento do IDC.

Na prática, o sucesso da IA é altamente influenciado pela variação no início do cio após a desmama, pela duração do cio, bem como pelo intervalo entre o início do cio e a ovulação (Weitze *et al.* 1994). Soede *et al.* (1995a) demonstraram que a fertilidade será ótima quando as inseminações forem realizadas de 0 a 24 horas, antes da ovulação.

Weitze *et al.* (1994) determinaram a frequência de distribuição da DE, em um estudo envolvendo 427 porcas examinadas através da ultrassonografia. A DE apresentou uma distribuição normal, sendo a duração mais curta, detectada em 12 porcas, de 32 horas (2,5%). Em 76% das fêmeas o cio durou entre 48 e 72 horas, enquanto que em 8 porcas (1,7%), ultrapassou as 96 horas. Apenas duas porcas apresentaram uma DE mais longa, de 152,5 e de 120 horas. O IDC influenciou a DE, sendo que nas porcas que entraram em cio muito cedo, a sua duração ultrapassou as 70 horas.

Steuerink *et al.* (1997) observaram diferenças na DE em porcas de diferentes ordens de parição. Assim, nas fêmeas de primeira e segunda ordens de parto, observaram uma menor DE do que nas porcas a partir da terceira ordem de parto.

Apesar da consistência na DE observada nos diferentes meses, dentro da granja, esta consistência na DE para as porcas individualmente não é alta. Assim, Andersson *et al.* (1983, citado por Steuerink *et al.*, 1999) observaram que, em cinco leitoas, o quarto estro foi 45 horas menor do que o segundo para uma das fêmeas, três horas maior que o segundo estro para duas fêmeas, nove horas superior ao segundo estro para outra fêmea, sendo ainda 33 horas maior para a quinta fêmea. Além disso, em duas partições consecutivas, a porcentagem de porcas com DE idênticas foi de 29% (31 de 106 porcas, sendo a detecção realizada a cada 12 horas).

A DE também pode ser influenciada pela genética. Desta forma, Willemse e Boender (1966) observaram que a variação na DE, dentro de um grupo de irmãs, foi significativamente menor do que a variação entre diferentes grupos de irmãs, sugerindo a existência de um fator ontogênico ou genético na DE.

Rydhmer *et al.* (1994) observaram uma correlação genética negativa entre a DE à puberdade ($1,8 \pm 1,7$ dias) e a taxa de crescimento até 90 kg, em 600 leitoas. Diante disto, afirmaram então que a seleção para parâmetros produtivos pode resultar em uma redução da DE.

Durante os últimos 60 anos, o desempenho das porcas com relação ao tamanho da leitegada tem mudado acentuadamente, enquanto a duração do cio não sofreu mudanças aparentes. Em 1930, a DE variava entre 40-46 horas (Gordon, 1997). Desta forma, os efeitos da seleção para produção sobre a DE podem ser considerados limitados (Soede e Kemp, 1997).

Considerando-se que a estratégia de inseminação ideal em suínos é aquela que garanta ótimo desempenho reprodutivo (taxa de parição e tamanho da leitegada), quando utiliza-se uma única inseminação, de preferência, associada à uma baixa concentração espermática; para alcançar tal façanha, existem duas maneiras. Primeiro, aumentar-se o período dentro do qual uma única IA proporciona ótimas taxas de fertilização, ou seja, aumentar a longevidade dos espermatozoides e/ou dos oócitos. Segundo, melhorar o momento da inseminação em relação à ovulação, ou seja, melhorar a previsão do momento da ovulação (Soede *et al.*, 2000).

A relação entre o IDC, a DE e o momento da ovulação parece fornecer informações mais detalhadas, capazes de possibilitar a implantação de um programa de IA mais eficiente. Porcas que entram em cio mais cedo, com um IDC menor que quatro dias,

têm, em média um cio mais longo em 20 horas, do que as fêmeas com IDC, entre 4 a 5 dias (Weitze *et al.*, 1994).

2.6. Inseminação artificial em suínos

A inseminação artificial é uma técnica de reprodução animal que consiste em introduzir o sêmen do macho, por meios instrumentais, no local mais apropriado do sistema genital da fêmea, de forma a possibilitar a ocorrência da fertilização. Desta forma, as variações e limitações da monta natural são substituídas por um procedimento artificial, que também tem suas limitações, mas que apresentam muitas vantagens em relação à monta natural (Wentz *et al.*, 2009).

Dentre as vantagens da IA, vale salientar a otimização de reprodutores geneticamente superiores, o descarte de ejaculados impróprios à reprodução e, conseqüentemente, a melhoria dos índices reprodutivos, associadas à uma maior biossegurança da granja (Wentz *et al.*, 2009).

A inseminação artificial fornece oportunidades únicas que permitem, tanto aos criadores de raças puras quanto aos produtores comerciais, o acesso ao que há de melhor e mais apurado em termos de material genético disponível na indústria, em determinado momento (Castagna, 2002).

As companhias de genética se esforçam para disponibilizar machos que estejam entre os melhores de suas raças, no que diz respeito à características produtivas economicamente importantes. Muitos desses machos foram submetidos à testes de progênie, sendo que pelo seu uso, os produtores podem eliminar a maior parte dos riscos econômicos incluídos na compra de machos para reprodução (Castagna, 2002).

A inseminação artificial em suínos trouxe benefícios pela rápida difusão de características desejáveis no rebanho, tais como a melhoria no ganho de peso e na conversão alimentar, menor deposição de gordura e melhor qualidade de carcaça, melhor aproveitamento de machos geneticamente superiores e redução dos custos de produção. Essas características permitiram a grande difusão desta biotécnica na suinocultura intensiva e tecnificada (Bortolozzo *et al.*, 2005b).

Atualmente, existem três técnicas de inseminação artificial que variam de acordo com o local de deposição do sêmen: a inseminação intra-cervical, a intra-uterina ou pós-cervical e a intra-uterina profunda.

A inseminação intra-cervical é uma técnica tradicional na espécie suína, que visa fixar-se a pipeta no cérvix, onde será feita a deposição da dose inseminante (Gordon, 1997). Trata-se de uma técnica consolidada na rotina de granjas tecnificadas e que responde por ótimos resultados reprodutivos, desde que bem empregada.

A dose inseminante contém geralmente $1-3 \times 10^9$ de espermatozoides em 80-100mL. A pipeta utilizada geralmente mimetiza a extremidade do pênis do varrão, o que permite sua fixação no canal cervical. Para a realização da inseminação é fundamental a presença de um macho sexualmente maduro, diante das fêmeas, objetivando estimulá-las pelo contato, audição, olfação e visão (Bortolozzo *et al.*, 2005b).

O procedimento sequencial começa com a limpeza a seco da vulva e introdução da pipeta, previamente lubrificada com algumas gotas da dose inseminante ou com gel. A inserção é feita no sentido dorso-cranial com movimento rotatório no sentido anti-horário. Ao final da infusão de toda a dose, a pipeta é retirada no sentido horário. Todo o procedimento é bastante simples, mas exige treinamento inicial da equipe de inseminadores, no que concerne à técnica e

higiene no momento da inseminação (Bortolozzo *et al.*, 2005b).

O ponto de estrangulamento de todo programa de inseminação artificial é a detecção de cio adequada, por isso, o treinamento da equipe deve começar por aí.

A necessidade de grande volume e número de espermatozoides na dose inseminante utilizada por via intra-cervical, deve-se, provavelmente, às características anatômicas do cérvix e dos cornos uterinos da porca. Os cornos uterinos, com comprimento de 50cm ou mais (Watson e Behan, 2002), e o cérvix representam grandes barreiras fisiológicas para a chegada das células espermáticas ao reservatório espermático, na junção útero-tubárica. Durante esse percurso, os espermatozoides estão sujeitos à ação fagocitária dos polimorfonucleares (Rozeboom *et al.*, 1999) que, aliada ao refluxo (Steeverink *et al.*, 1999), representam as principais formas de eliminação espermática do sistema genital feminino.

Desta forma, apesar dos bons resultados obtidos com esta técnica, um número limitado de doses pode ser preparado a partir de um ejaculado. Para aumentar a eficiência de utilização dos machos de alto mérito genético, várias estratégias têm sido propostas, incluindo o desenvolvimento de novas técnicas de inseminação, a partir de mudanças no local de deposição do sêmen (Martinez *et al.*, 2006).

Assim, um método prático para reduzir o número de espermatozoides por dose inseminante é a utilização da inseminação intra-uterina. Neste sentido, novos procedimentos para a deposição do sêmen no corpo do útero (inseminação pós-cervical; Watson e Behan, 2002) ou nos cornos uterinos (inseminação intra uterina profunda, Vazquez *et al.*, 1999), tem sido descritos recentemente.

Com relação à inseminação pós-cervical, vários instrumentos diferentes têm sido desenvolvidos para ultrapassar o cérvix e depositar a dose no corpo uterino das porcas. De acordo com Watson e Behan (2002), a IA pós-cervical na porca é simples, efetiva e segura, permitindo que o número de espermatozoides por dose seja reduzido para um bilhão. No entanto, Rozeboom *et al.* (2004), ao contrário, afirmam que o número de leitões nascidos totais é marcadamente inferior (1,5 menos leitões), para as porcas submetidas à inseminações pós-cervical.

Apesar da complexa anatomia do cérvix e dos cornos uterinos da porca, um cateter flexível, para a inseminação intra uterina profunda (IUP) não cirúrgica, em porcas não sedadas, foi desenvolvido (Martinez *et al.*, 2001,2002). Ao utilizar-se este sistema, o sêmen pode ser depositado entre 8 e 55 cm distante da junção útero-tubárica (Martinez *et al.*, 2002). Quando comparada com a inseminação intra-cervical tradicional (3 bilhões de espermatozoides em 80-100mL), o número de espermatozoides pode ser reduzido em 20 vezes na IUP, podendo ser o volume reduzido 8-20 vezes, sem prejuízos à taxa de parição ou ao tamanho da leitegada (Martinez *et al.*, 2002).

2.6.1 Momento ideal de inseminação

O tempo de vida dos oócitos após a ovulação, bem como dos espermatozoides, de forma a proporcionar que um número suficiente de células espermáticas alcance as tubas uterinas com capacidade de fertilização, define o período relativo à ovulação, no qual as inseminações podem ser realizadas com sucesso quanto as taxas de fertilização (Hunter, 1994).

Estudos feitos nos anos 60 já mostravam que porcas inseminadas relativamente cedo ou tarde, durante o estro, apresentavam uma

redução significativa das taxas de fertilização, das taxa de parição e do tamanho da leitegada (Willemse e Boender, 1962; citados por Soede *et al.*, 2000).

Nos últimos anos, alguns trabalhos vem sendo publicados, envolvendo as chances de fertilização, em relação ao momento da ovulação, sem indução hormonal. Sabe-se que em porcas, ótimos resultados de fertilidade podem ser alcançados quando as IA's ocorrem dentro de um período de até 40 horas antes, até 16 horas depois da ovulação (Soede *et al.*, 1995). No entanto, para a maioria das porcas, este intervalo é de 12 até 24 horas, no máximo, antes da ovulação (Soede *et al.*, 1995; Steverink *et al.*, 1997).

De acordo com Soede *et al.* (2000), quando as inseminações são realizadas entre 0 e 24 horas pré-ovulação, se 20 oócitos forem ovulados, 18 serão fertilizados.

Sabe-se que as IA's realizadas a intervalos superiores à 24 horas, antes da ovulação, estão associadas a reduzidas taxas de fertilidade. Isto significa que a vida fértil de um número suficiente de espermatozoides é limitada a um período de 24 horas, na maioria das porcas. No que se refere à redução da fertilidade, quando as IA's ocorrem após a ovulação, observa-se que a vida fértil dos oócitos é similar ao tempo necessário à capacitação espermática e também ao tempo necessário para que alcancem o local da fertilização (Soede *et al.*, 2000).

Diante da grande variação observada quanto à manifestação do estro, bem como à baixa previsibilidade do momento da ovulação, torna-se muito difícil inseminar porcas apenas nos intervalos ótimos antes da ovulação. Desta forma, a maioria das porcas é inseminada várias vezes durante o cio (Soede *et al.*, 2000).

2.6.2 Número e intervalo entre inseminações

Em granjas comerciais, é comum o uso de múltiplas inseminações por cio (Foxcroft *et al.*, 2008; Vazquez *et al.*, 2008). Isso ocorre em função da longa duração do estro, visando compensar a imprecisão na estimativa do momento da ovulação. Normalmente, os protocolos de IA's usados em granjas comerciais envolvem 2-3 inseminações durante o cio, cada uma com um total de espermatozoides entre $2,5-3 \times 10^9$ (Bortolozzo e Wentz, 1997; Johnson *et al.*, 2000).

O intervalo entre a inseminação artificial e a ovulação influencia a taxa de fertilização em suínos (Soede *et al.*, 1995). Assim, as melhores taxas de fertilidade ocorreram quando as inseminações foram realizadas entre 24 e 0 horas antes da ovulação (Soede *et al.*, 1995a).

A influência da frequência de inseminações sobre o desempenho reprodutivo das porcas tem sido descrita, em inúmeros trabalhos. Duplas inseminações durante o cio melhoram a taxa de gestação e o tamanho da leitegada, em relação aos resultados oriundos de uma única inseminação. Quando as porcas foram inseminadas três vezes durante o cio, apresentaram aumento da taxa de gestação e do tamanho da leitegada, em comparação às inseminadas apenas duas vezes (Xue *et al.*, 1998a).

Uma questão recorrente é se as inseminações devem ser realizadas a intervalos de 12 ou 24 horas. Resultados de um estudo na Alemanha demonstraram que rebanhos onde as porcas eram inseminadas a cada 12 horas não apresentaram melhor desempenho reprodutivo do que aqueles envolvendo inseminações a intervalos de 24 horas. Isto indica que o número de inseminações por estro pode ser reduzido, sem consequências negativas na fertilidade (Soede *et al.*, 2000).

Deve-se considerar, no entanto, que alguns fatores podem influenciar o intervalo entre as inseminações, tais como o período de armazenamento do sêmen. Neste sentido, observou-se que os intervalos entre as inseminações devem ser reduzidos, quando as inseminações forem realizadas com sêmen resfriado e estocado (Soede *et al.*, 2000).

Xue *et al.* (1998b) reportaram que a fertilidade foi melhor nas fêmeas que receberam duas inseminações do que nas que receberam apenas uma. Em porcas, a dupla IA pode levar ao aumento da fertilidade, mas não a um maior tamanho da leitegada. No entanto, nas leitoas inseminadas duas vezes ou mais, as leitegadas foram maiores do que naquelas inseminadas apenas uma vez.

Na prática, quando apenas uma inseminação é realizada, o intervalo entre esta inseminação e a ovulação tem maiores chances de exceder 24 horas (Soede *et al.*, 2000).

Taroco *et al.* (2001) inseminaram leitoas e porcas uma ou duas vezes, sendo utilizado o intervalo de 12 horas entre as IA's para as leitoas e de 24 horas para as porcas. Os autores observaram que a taxa de parição foi menor quando a DE foi superior à 36 horas, tanto para as leitoas inseminadas apenas uma vez quanto para as porcas inseminadas duas vezes.

La Pierre, em 1994, sugeriu que três inseminações realizadas à intervalos de 24 horas podem prejudicar a fertilidade e aumentar a incidência de descarga vaginal.

Em suínos, grande volume de sêmen é depositado no útero, acompanhado pela indução de uma resposta inflamatória caracterizada por grande influxo de neutrófilos, duas horas após a inseminação (Lovell e Getty, 1968; Rodriguez-Martinez *et al.*, 1990). Para garantir ótimo desenvolvimento embrionário, o excesso de sêmen e de produtos inflamatórios precisam

ser eliminados do útero (Pope *et al.*, 1990). Este mecanismo de “clearance” uterino pode estar relacionado à atividade miometrial em porcas, assim como em éguas (Troedsson *et al.*, 1993). No entanto, a motilidade uterina diminui drasticamente ao final do estro em porcas (Bower *et al.*, 1974).

Tem sido observado 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 dos relatos de que uma terceira inseminação pode melhorar o desempenho reprodutivo, Rozeboom *et al.* (1997) demonstraram que uma IA, realizada ao final do estro, pode prejudicar a eficiência das inseminações anteriores. Segundo os autores, as fêmeas foram inseminadas a intervalos de 24 horas imediatamente após a detecção do cio, com uma inseminação 24 horas após a última, independentemente das porcas estarem em cio ou não. A última IA causou uma redução da taxa de parto das fêmeas, tanto em primíparas quanto nas porcas de segunda ordem de parição (23% e 22%, respectivamente), bem como no tamanho da leitegada.

Espermatozoides acessórios representam uma população de células espermáticas capazes de atravessar as barreiras do sistema genital feminino e penetrar parcialmente na zona pelúcida, durante a fertilização (Weitze *et al.*, 1989; Saacke *et al.*, 1994). Grande número de células espermáticas acessórias indica curto intervalo entre a inseminação e a ovulação (Soede *et al.*, 1995a,b; Steverink *et al.*, 1999).

Neste sentido, Steverink *et al.* (1999) inseminaram porcas com doses contendo 1×10^9 , 3×10^9 e 6×10^9 de espermatozoides. As doses contendo 1×10^9 foram utilizadas para inseminar as fêmeas, dentro de um intervalo previsto até a ovulação, de 12 a 24 horas. As doses contendo 6×10^9 de

espermatozoides foram utilizados dentro de um intervalo previsto de 24 a 36 horas até a ovulação. Para o grupo controle utilizou-se doses de 3×10^9 , intervalos de 12-24 horas e de 24-36 horas até a ovulação. Os autores observaram que nas porcas inseminadas 0-12 horas antes da ovulação, a contagem de espermatozoides acessórios variou de 1 a 216. Observou-se, ainda, a presença de um grande número de células espermáticas acessórias (>75) apenas quando as inseminações foram realizadas até, no máximo, 18 horas antes da ovulação. O intervalo da inseminação à ovulação teve efeito significativo na taxa de fertilização e no número de espermatozoides acessórios, independentemente da concentração utilizada nas inseminações.

Os resultados reprodutivos de uma granja são, provavelmente, influenciados indiretamente pela duração do estro, devido à chance das fêmeas serem inseminadas pelo menos uma vez no período ótimo antes da ovulação. As granjas caracterizadas pelas melhores taxas de parição e número de nascidos apresentaram uma maior duração do estro (Steeverink *et al.*, 1999).

Existem duas importantes questões a se considerar quando do desenvolvimento de um protocolo ou estratégia de inseminação. Inicialmente, o efeito do momento da inseminação em relação à ovulação sobre a fertilidade. Em segundo lugar, se enfatizam as possibilidades de se predizer o momento da ovulação, de modo a adaptar-se o momento das inseminações. Deve-se considerar ainda, a qualidade do sêmen que será utilizado nas inseminações (Steeverink *et al.*, 1999).

2.6.2.1. Sincronização do cio, sincronização da ovulação e inseminação artificial em tempo fixo

O número de dias não produtivos médios de uma fêmea suína, que são os dias em que uma matriz não está gestando e nem tão pouco lactando, é considerado o principal fator a influenciar o número de leitões desmamados por porca por ano. Neste contexto, o intervalo transcorrido entre a desmama e o cio é o período de maior impacto nos dias não produtivos.

Grande número de estudos têm reportado que a fertilidade máxima é alcançada quando as fêmeas são inseminadas dentro de um intervalo de no máximo 24 horas pré-ovulação até no máximo, 8 horas após a ovulação (Kemp e Soede, 1996). Se o momento da ovulação pudesse ser determinado de forma precisa, uma única inseminação por cio poderia provavelmente ser efetiva para alcançar taxas de parição ideais, o mesmo podendo ser dito quanto ao tamanho das leitegadas (Pelland, 2007).

O controle do ciclo reprodutivo suíno tem sido alvo de intensa pesquisa científica há mais de 40 anos (Estill, 2000). Apesar disto, os produtores de suínos continuam tendo limitada disponibilidade de métodos para alterar o ciclo reprodutivo do rebanho em comparação com o que se observa na produção de bovinos. A capacidade de controlar o momento do cio em porcas cíclicas poderia facilitar a introdução de leitões no rebanho, assim como a inseminação de porcas após o desmame (Estill, 2000).

Apesar dos métodos de sincronização do cio em suínos serem variados, todos se baseiam tanto no controle dos eventos que levam à maturação folicular e a ovulação ou na alteração da meia-vida do corpo lúteo (Pelland, 2007). Estill (2000) relatou que as primeiras tentativas farmacológicas de manipular o ciclo estral de porcas cíclicas

envolveu a administração de progestágenos visando a inibição dos estágios finais de desenvolvimento folicular. Deste modo, com a queda da progesterona, a maturação folicular ocorria de maneira rápida permitindo que a ovulação ocorresse dentro de um intervalo previsto de tempo.

Sabe-se que a ovulação nas porcas ocorre quando transcorridos aproximadamente 70% do período de duração do cio (Soede *et al.*, 1995a). No entanto, a duração do cio tem grande variabilidade, o que torna difícil prever o momento da ovulação e assim a realização da inseminação artificial no momento ótimo, em relação à ovulação, para garantir a máxima fertilidade. Apesar da duração do cio ser uma maneira fácil para se prever o momento da ovulação, a incapacidade de se prever a sua duração, limita a sua utilização. A variação do momento do pico pré-ovulatório do LH em relação ao início do cio é considerada como a principal causa para as diferenças observadas, no que se refere ao momento da ovulação (Zak *et al.*, 2010). Por este motivo, na prática, as porcas são normalmente inseminadas 2 a 4 vezes à intervalos variando de 12 a 24 horas durante o cio. Esta variabilidade observada no intervalo transcorrido entre o início do cio e a ovulação é exacerbada em animais sofrendo estresse térmico, o que torna ainda mais difícil a determinação do momento ideal da inseminação, em relação à ovulação (Tummaruk *et al.*, 2011).

Neste sentido, protocolos hormonais visando o controle do momento da ovulação têm sido desenvolvidos, contribuindo para a utilização da inseminação artificial em tempo fixo em leitoas e porcas (Tummaruk *et al.*, 2011). Dentre os hormônios usados nestes protocolos estão a Gonadotrofina Coriônica Humana (Human Corionic Gonadotropin- hCG) (DeRensis *et al.*, 2003; Cassar *et al.*, 2004); o Hormônio Liberador de Gonadotrofinas (Gonadotropins Release Hormone – GnRH) (DeRensis *et al.*, 2003; Martinat-Botte *et*

al., 2010) e o Hormônio Luteinizante Suíno (Porcine Luteinizing Hormone – pLH) (Cassar *et al.*, 2005; Abad *et al.*, 2007).

Para Dziuk e Baker (1962), o intervalo entre a administração de hCG e a ovulação na porca é de 36-40 horas. Para Hunter (1967) e Roca *et al.* (2003), as porcas tendem a ovular após aproximadamente 42 horas e, aproximadamente, 38 horas após o tratamento com GnRH (Brussow *et al.*, 2009) ou LH (Abad *et al.*, 2007). No entanto, estes tratamentos durante o período de desmama têm sido associados a um aumento da mortalidade embrionária devido à queda da qualidade dos oócitos (Martinat-Botté *et al.*, 1990).

O intervalo transcorrido entre a aplicação da hCG e a ovulação é similar ao intervalo observado entre o pico endógeno de LH e a ovulação, em porcas desmamadas (Willis *et al.*, 2003).

Martinat-Botté *et al.* (2010) demonstraram que a administração de 10µg de buserelina (Receptal®, Intervet Co. Ltda), um agonista do GnRH, após a aplicação de 20mg/kg de altrenogest (progestágeno) por 18 dias (Regumate®, Intervet Co. Ltda), foi capaz de induzir e sincronizar a ovulação em leitoas púberes. De acordo com os autores a sincronização pode ser feita de três diferentes formas: 1) através de um tratamento com GnRH após 104 ou 120 horas do tratamento com altrenogest; 2) utilizando-se uma combinação de 800 UI de eCG (Gonadotrofina Coriônica Equina) e GnRH após 24 horas; 3) utilizando-se um tratamento com GnRH, 24 horas após o tratamento com altrenogest. Os autores observaram que o intervalo entre o final do tratamento com altrenogest até a ovulação nas leitoas tratadas com GnRH às 104 horas ou com a combinação da eCG e GnRH foi menor do que nas leitoas tratadas com GnRH às 120 horas após o tratamento com o altrenogest. Para as porcas, o tratamento com GnRH às 94 horas após a desmama foi capaz de induzir e sincronizar a ovulação

com maior sucesso do que o tratamento com GnRH às 104 horas após a sua ocorrência.

O protocolo para indução da ovulação mais utilizado, em suínos, envolve a aplicação da gonadotrofina coriônica equina (eCG) para estimular o crescimento folicular, seguido pela gonadotrofina coriônica humana (hCG) para estimular a ovulação. No entanto, há grandes variações nos resultados obtidos com este protocolo. Além disso, existem evidências de que o estímulo ovariano exógeno pode ser deletério para a função reprodutiva futura em leitoas. Assim, tem sido observado que leitoas pré-púberes tratadas com eCG e hCG têm reduzidas taxas de gestação, porque a maturação oocitária pode ser influenciada por hormônios exógenos, tais como a hCG, o que pode reduzir a qualidade embrionária (Degenstein *et al.*, 2008).

O PG600[®] é um produto composto por 400 UI de eCG e 200 UI de hCG. O eCG tem efeito tipo FSH, levando ao desenvolvimento e maturação folicular, enquanto a hCG tem função LH, estimulando a ovulação. O PG600[®] é usado para induzir a ciclicidade em leitoas pré-púberes ou em porcas desmamadas em anestro. Quando fornecido à leitoas pré-púberes, acima de 30%, normalmente, podem não exibir cio. Algumas preparações de eCG puro são disponibilizadas e algumas vezes utilizadas para indução do cio. Além disso, as preparações puras fornecidas em altas doses (900 UI) podem melhorar a responsividade de porcas de primeira ordem de parto (Cassar, 2009).

A prostaglandina F2 α exógena pode ser utilizada também para a sincronização do cio de porcas ou leitoas, por provocar abortamento em porcas com gestações recentes, acompanhado por um retorno subsequente ao cio, dentro de 3 a 5 dias. Tal protocolo pode ser utilizado para que estas fêmeas entrem em cio no momento desejado (Cassar, 2009). No entanto, não há

sincronização da ovulação devido à impossibilidade de se prever a duração do cio induzido.

Pesquisas recentes têm demonstrado que o Hormônio Luteinizante Suíno ou Porcine Luteinizing Hormone (pLH) pode sincronizar a ovulação em porcas desmamadas. Estes estudos envolveram a utilização de 600 UI de eCG no dia da desmama e 5 mg de pLH exógeno, 72-80 horas depois da aplicação da eCG. Em um estudo realizado por Candini *et al.* (2001), a ovulação ocorreu após 35,7 horas da aplicação do pLH; já Cassar *et al.* (2005), observaram ovulação às 38,2 horas após a aplicação do pLH, enquanto no estudo de Viana *et al.* (2002), as ovulações ocorreram 39,2 horas após a aplicação do pLH. Além disso, sugere-se que a utilização do pLH pode melhorar a qualidade do corpo lúteo formado após a indução da ovulação (Ambrose *et al.*, 2005).

Degenstein *et al.* (2008) observaram que a aplicação de 5 mg de pLH (Lutropin[®]) intramuscular em leitoas aumentou a amplitude do pico de LH, em relação ao pico de LH pré ovulatório das leitoas não tratadas; além disso, o intervalo transcorrido do tratamento à ovulação foi mais sincronizado em resposta ao pLH.

Gama *et al.* (2005) estudaram a utilização de diferentes doses de pLH (Lutropin[®]) na indução e sincronização da puberdade em marrãs. Neste estudo, foram utilizadas 67 fêmeas com 140 dias de idade e 86 kg de peso vivo, submetidas a três diferentes tratamentos. No T1 ou grupo controle, as fêmeas receberam 600 UI de eCG (Novormon[®]) e após 72 horas, 5,0 mg de pLH; no T2 receberam 600 UI de eCG e após 72 horas, 2,5 mg de pLH. Finalmente, no T3 receberam 600 UI de eCG e 72 horas depois, 1,25 mg de pLH. Não houve diferença estatística, entre os tratamentos, quanto ao percentual de cios, embora o melhor intervalo entre o tratamento e a ovulação ocorresse no grupo de fêmeas do

T2 (38,26±2,84). A duração do estro foi similar entre os tratamentos. Os autores concluíram, desta forma, que a combinação de 600 UI de eCG e 2,5 mg de pLH foi a mais efetiva na indução e sincronização do estro e ovulação em fêmeas suínas pré-púberes.

Os protocolos de sincronização são indicados principalmente naquelas granjas apresentando problemas no intervalo entre a desmama e o cio subsequente (IDC). Rebanhos com baixa produtividade, apresentando menos de 75% das fêmeas cobertas até cinco dias após a desmama, demonstraram uma melhoria acentuada de seu desempenho reprodutivo acompanhando a utilização da indução da ovulação. Nestes rebanhos, houve uma variação de 20% a 40%, quanto ao número de porcas inseminadas até os cinco dias após a desmama. Rebanhos com alta produtividade, ou seja, aqueles apresentando uma proporção de porcas inseminadas até cinco dias pós desmame superior a 75%, estão no nível superior dos parâmetros reprodutivos e economicamente desejáveis. Neles, há pouco espaço para o uso de protocolos hormonais visando melhoria dos resultados já obtidos (Pelland, 2007).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Localização geográfica, caracterização climática e período experimental

Os experimentos foram realizados nas instalações da Fazenda Miunça, localizada nas proximidades de Brasília, no Distrito Federal, situado a 1000-1200 metros de altitude, 15°47' de latitude sul e a 47°57' de longitude oeste (Dados metereológicos do INMET - Instituto Nacional de Meteorologia - www.inmet.gov.br/portal).

O período experimental compreendeu os meses de novembro de 2010 a Julho de 2011, estando os dados metereológicos deste período apresentados na tabela 7.

3.2. Delineamento experimental e animais utilizados

Foram realizados dois experimentos visando otimizar o transporte do sêmen de varrões diluído e resfriado utilizando o contêiner proposto por Roner *et al.*, (2006). Este sistema tem a capacidade de acomodar doze doses de sêmen com 100 mL cada, permitindo a inseminação de seis porcas com duas doses de sêmen/ fêmea ou a inseminação de quatro porcas com três doses de sêmen/ciclo estral.

Tabela 7: Dados metereológicos referentes à região de Brasília durante o período experimental

Mês/Ano	Temperatura Máxima - Média	Temperatura Mínima - Média	Precipitação - Soma
Novembro/10	25,7	17,1	258,8
Dezembro/10	26,5	17,6	276,2
Janeiro/11	26,1	17,4	204,4
Fevereiro/11	27,4	17,3	164,2
Março/11	26,5	17,5	242,0
Abril/11	26,8	16,5	50,4
Mai/11	26,2	14,7	1,6
Junho/11	25,9	13,8	1,6
Julho/11	27,0	14,2	0,0

Fonte: Estação... (2011)

No entanto, com a verticalização da suinocultura, essa proposta se torna inviável do ponto de vista comercial, por ser o número de doses pequeno diante do grande número de fêmeas a serem inseminadas/dia na empresa suinícola.

Desta forma, propôs-se o transporte do sêmen envasado com duas diferentes concentrações espermáticas (15 ou 24 bilhões de espermatozoides/ dose de 100 mL pré-rediluição), antes de uma rediluição, para uma concentração padrão de 3×10^9 espermatozoides/ dose inseminante, sendo esta concentração usada na rotina das empresas para a inseminação artificial.

Pretendeu-se então, otimizar o transporte de doses por contêiner, com número diferente de doses a serem transportadas, de acordo com a concentração original da dose pré-rediluição.

Nos experimentos I e II avaliou-se a fertilidade de fêmeas inseminadas com doses padrão de 3 bilhões de espermatozóide em 100 mL, oriundas de doses com 15 ou 24 bilhões de espermatozoides pré-rediluição, respectivamente, sendo estas re-diluídas após 12 horas de armazenamento a 5°C, previamente à sua utilização.

3.2.1. Experimento I: Eficiência reprodutiva de fêmeas suínas inseminadas com sêmen oriundo de doses heterospérmicas hiperconcentradas, contendo 15 bilhões de espermatozoides, resfriadas à 5°C e rediluídas para doses inseminantes de 100 mL, contendo 3 bilhões de espermatozoides, após 12 horas de armazenamento

Foram utilizados neste experimento 24 ejaculados de nove varrões, sendo três da raça Large White e seis da raça Landrace, pertencentes à Central de Inseminação

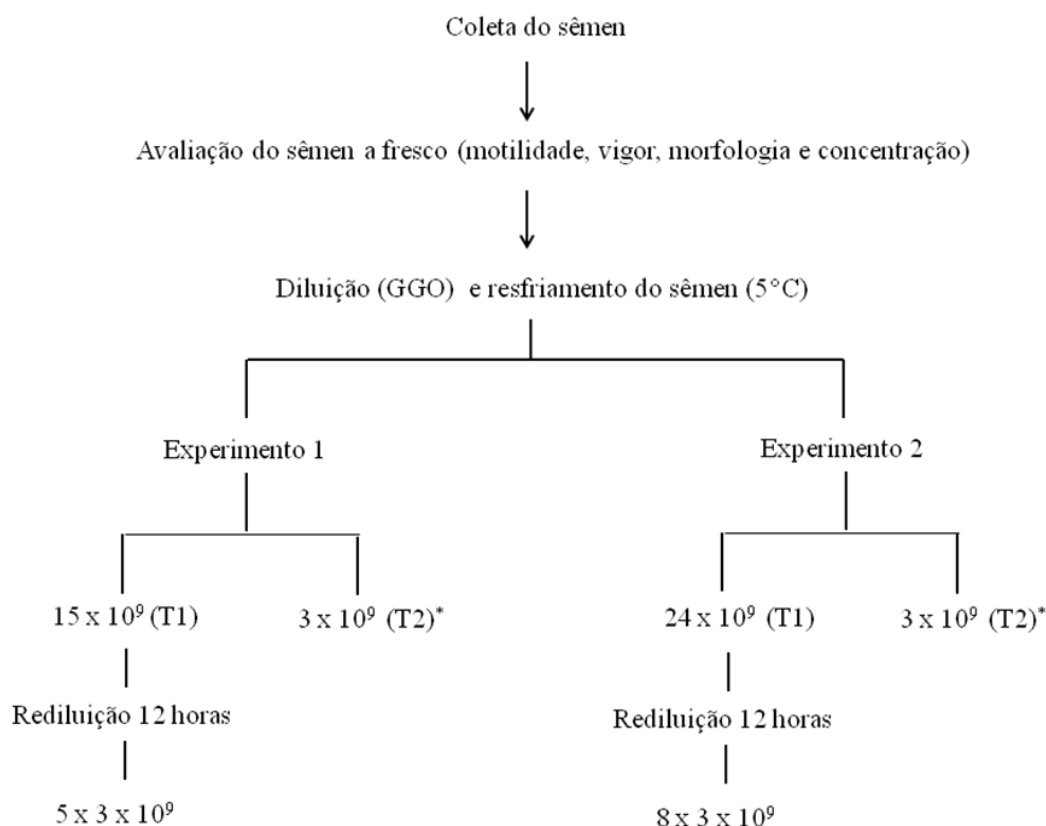
Artificial da Fazenda Miunça, núcleo filial da empresa DB-Danbred do Brasil. Todos os machos usados possuíam idade superior a 12 meses, com fertilidade e qualidade seminal comprovadas após avaliação do desempenho reprodutivo, de acordo com os dados reprodutivos da granja e avaliação andrológica dos mesmos.

Para as inseminações, foram usadas 20 fêmeas DB-25[®], de primeira ordem de parto, distribuídas de forma inteiramente casualizada entre os dois tratamentos descritos abaixo:

Tratamento 1 (E1T1-15B): as doses inseminantes foram oriundas de doses superconcentradas produzidas a partir dos primeiros 15 mL da fração rica ou P1 dos ejaculados de dois machos. Os 15 mL de sêmen do primeiro macho foram imediatamente pré-diluídos em 30 mL do diluidor GGO (Foote, 2002) e em seguida mantidos em banho-maria a 36°C. Após a coleta dos primeiros 15 mL do ejaculado do segundo macho, estes foram acrescentados aos 45 mL já existentes devido à primeira pré-diluição, o que forneceu uma pré-diluição final de 1:1.

Posteriormente, procedia-se à avaliação da concentração espermática do sêmen heterospérmico e preparação das doses a serem resfriadas. As doses inseminantes de 100 mL contendo 15 bilhões de espermatozoides foram resfriadas a 5°C em contêiner especial proposto por Roner *et al.* (2006). Após 12 horas de armazenamento, estas doses foram rediluídas para doses padrão contendo 3×10^9 de espermatozoides móveis por dose inseminante. Após a rediluição as doses foram ainda mantidas a 5°C por um período de estocagem máximo de 36 horas após a coleta ou 24 horas após a rediluição. As fêmeas foram inseminadas após a rediluição para 3×10^9 de espermatozoides (n=10).

Figura 1: Delineamento experimental e processamento do sêmen durante os experimentos



*O número de doses para o T2 variava de acordo com a concentração dos ejaculados coletados

Tratamento 2 (E1T2-3B): As doses inseminantes foram oriundas dos primeiros 15 mL da fração rica (P1) dos ejaculados de dois varrões, diluídos em diluidor GGO (Foote, 2002) produzindo doses de 100 mL contendo 3×10^9 de espermatozoides móveis por dose inseminante, que foram resfriadas a 5°C em contêiner especial proposto por Roner *et al.* (2006), sendo o tempo de armazenamento máximo de até 36 horas após a coleta do ejaculado. As fêmeas foram inseminadas após o armazenamento das doses a 5°C por 12 h até 36 horas (n=10).

Deste modo, nota-se que as doses pertencentes aos tratamentos 1 e 2 foram produzidas a partir dos primeiros 15 mL da fração rica espermática (FRE) do ejaculado

ou P1, sendo sempre coletados dois machos (M1 e M2) de cada vez.

Para o tratamento 1, após 12 horas de armazenamento, o sêmen hiperconcentrado era rediluído para doses padrão de 3 bilhões de espermatozoides em volume de 100 mL, que eram então utilizadas para as inseminações.

Após a coleta, avaliação e diluição do sêmen, o mesmo foi resfriado e armazenado a 5°C em um contêiner desenvolvido para a espécie suína por Roner *et al.*, em 2006. As doses eram ali armazenadas por até 36 horas após coleta, ou 24 horas após rediluição para as doses do T1.

Como delineamento experimental utilizou-se o inteiramente casualizado, sendo as

vinte fêmeas distribuídas por sorteio entre os dois tratamentos.

Após as inseminações as fêmeas foram acompanhadas até o parto, sendo todas as ocorrências deste intervalo devidamente registradas. O diagnóstico de gestação foi feito utilizando-se a rufiação de retorno ao cio, do 17º dia após a inseminação até o 30º dia, observando-se o reflexo de tolerância ao homem na presença do macho, edema e hiperemia vulvar, sendo todos os dados anotados em fichas (Item 8.3). A taxa de gestação foi avaliada através da taxa de não retorno ao cio, detectada pela rufiação das fêmeas. No momento do parto foram avaliadas a taxa de parto de cada tratamento e as características das leitegadas (número de leitões nascidos totais, nascidos vivos, natimortos, mumificados e mortos ao nascer), além do período de duração do parto, e do mesmo modo, todos os dados foram anotados em fichas (Item 8.4).

3.2.2. Experimento II: Eficiência reprodutiva de fêmeas suínas inseminadas com sêmen oriundo de doses heterospérmicas hiperconcentradas, contendo 24 bilhões de espermatozoides, resfriadas à 5°C e rediluídas para doses inseminantes de 100 mL, contendo 3 bilhões de espermatozoides, após 12 horas de armazenamento

Foram utilizados neste experimento 22 ejaculados de nove varrões, sendo três da raça Large White e seis da raça Landrace, pertencentes à Central de Inseminação Artificial da Fazenda Miunça, núcleo filial da empresa DB-Danbred do Brasil. Todos os machos usados possuíam idade superior a 12 meses, com fertilidade e qualidade seminal comprovadas após avaliação do desempenho reprodutivo, de acordo com os dados reprodutivos da granja e avaliação andrológica dos mesmos.

Para as inseminações, foram usadas 20 fêmeas DB-25[®] de primeira ordem de parto, distribuídas de forma inteiramente casualizada entre os dois tratamentos descritos abaixo:

Tratamento 1 (E2T1-24B): fêmeas inseminadas com doses inseminantes de 100 mL, contendo 3×10^9 espermatozoides móveis. Estas doses inseminantes foram oriundas de doses superconcentradas produzidas a partir dos primeiros 15 mL da fração rica (P1) do ejaculado de dois machos, contendo 24 bilhões de espermatozoides por dose, diluídos em diluidor GGO (Foote, 2002), envasados em doses de 100 mL, resfriadas a 5°C, em contêiner especial (Roner *et al.*, 2006) e rediluídas para doses padrão de 3×10^9 espermatozoides móveis/dose inseminante, após 12 horas de armazenamento. Após a rediluição as doses foram mantidas por um tempo de estocagem máximo de 36 horas após a coleta do sêmen (n=10);

Tratamento 2 (E2T2-3B): fêmeas inseminadas com doses inseminantes de 100 mL, contendo 3×10^9 espermatozoides móveis. Estas doses foram oriundas dos primeiros 15 mL da fração rica (P1) do ejaculado de dois machos, diluídos em diluidor GGO (Foote, 2002) para produzir doses de 100 mL, contendo 3×10^9 espermatozoides móveis/dose inseminante, resfriadas a 5°C em contêiner especial (Roner *et al.*, 2006), sendo o tempo de armazenamento máximo de até 36 horas após a coleta do sêmen (n=10).

As doses pertencentes aos tratamentos 1 e 2 foram produzidas a partir dos primeiros 15 mL da fração rica espermática (FRE) do ejaculado ou P1, sendo sempre coletados dois machos (M1 e M2) por procedimento. Assim, os primeiros 15 mL do primeiro macho foram coletados e imediatamente pré-diluídos em 30 mL do diluidor GGO e mantidos em banho-maria à 36°C. Ao final da coleta dos dois machos, obtinha-se um volume de sêmen de 30 mL (15 mL do M1

+ 15 mL do M2) diluídos em 30 mL do diluidor GGO, alcançando-se uma pré-diluição 1:1, antes dos procedimentos envolvendo a determinação da concentração e preparação das doses a serem resfriadas.

Para o tratamento 1, após 12 horas de armazenamento, o sêmen hiperconcentrado foi rediluído para doses padrão de 3 bilhões de espermatozoides em volume de 100 mL, que foram então utilizadas para as inseminações.

Assim como no experimento 1, após a coleta, avaliação e diluição do sêmen, o mesmo foi resfriado e armazenado a 5°C em um contêiner desenvolvido para a espécie suína por Roner *et al.*, em 2006. As doses eram ali armazenadas por até 36 horas após coleta, ou 24 horas após a rediluição para as doses do T1.

Como delineamento experimental utilizou-se o inteiramente casualizado, sendo as vinte fêmeas distribuídas por sorteio entre os dois tratamentos.

Após as inseminações as fêmeas foram acompanhadas até o parto, sendo todas as ocorrências deste intervalo devidamente registradas. O diagnóstico de gestação foi feito utilizando-se a rufiação de retorno ao cio, do 17° até o 30° dia após as inseminações, observando-se o reflexo de tolerância ao homem na presença do macho, edema e hiperemia vulvar. A taxa de gestação foi avaliada utilizando-se a taxa de não retorno ao cio, detectada pela rufiação das fêmeas, sendo todos os dados anotados em fichas (Item 8.3). No momento do parto foram avaliadas a taxa de parto de cada tratamento bem como as características das leitegadas (número de leitões nascidos totais, nascidos vivos, natimortos, mumificados e mortos ao nascer), além do período de duração do parto, e do mesmo modo, todos os dados foram anotados em fichas (Item 8.4).

3.3. Procedimentos relacionados aos machos

3.3.1. Alojamento, manejo nutricional e reprodutivo dos varrões durante o período experimental

Os machos eram mantidos em baias individuais, com temperatura controlada e água *ad libitum*. Em todas as baias havia cama de casca de arroz. A ração era fornecida duas vezes ao dia, sendo utilizados dois tratos com 1,5 kg/trato. Os teores nutricionais da ração fornecida durante o período experimental estão descritos na tabela 8.

3.3.2. Coleta do sêmen

As coletas de sêmen foram realizadas às 6:30 horas e às 16:00 horas, durante os experimentos I e II.

No momento da coleta os machos eram conduzidos à gaiola de higienização, quando se realizava 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. Em seguida, os machos eram deslocados para a sala de coleta, na qual havia um manequim fixo com altura regulável. Nesta, o piso era aderente e livre de objetos que pudessem distrair o macho no momento da coleta. O intervalo entre coletas dos machos em experimentação variou de dois a sete dias, em virtude da sua utilização paralela para as inseminações da rotina da granja, de modo que a necessidade de coleta para o experimento e para a granja nem sempre possibilitava a manutenção de intervalos ideais.

Assim que o macho saltava sobre o manequim, nova limpeza com papel toalha era realizada na região do prepúcio.

Para reduzir o intervalo de tempo entre as coletas dos dois machos, assim que se iniciava a coleta do primeiro macho da dupla, o segundo macho era então conduzido à gaiola de higienização, sendo realizados os mesmos procedimentos de limpeza descritos anteriormente.

O método de coleta foi o da mão enluvada descrito por Hancock e Howell (1959). O

sêmen foi coletado em recipiente plástico (tubo tipo Falcon com capacidade para 50 mL) seco e esterilizado, mantido previamente em estufa à 37°C e protegido de variações de temperatura por material isotérmico durante a coleta. Acoplado ao tubo Falcon, utilizou-se um funil de plástico de modo a facilitar a coleta dos primeiros 15 mL da fração rica, sendo que na entrada do funil foi colocado papel filtro (filtro descartável® - Minitub do Brasil), de modo a separar-se a fração gelatinosa do sêmen (Figura 2).

Tabela 8: Teores nutricionais da ração fornecida aos reprodutores durante o período experimental

Constituintes da Ração	Teores
Proteína (%)	19,0220
Energia Metabolizável (Kcal/Kg)	3255,0000
Fibra Bruta (%)	4,3354
Cálcio Disponível (%)	1,0295
Fósforo Total (%)	0,6264
Fósforo Disponível (%)	0,4687
Extrato Etéreo (%)	5,5175

Fonte: GPD Consultoria (Empresa de consultoria que presta assistência à fazenda Miunça no que concerne a nutrição dos animais. Dados de manejo da granja).

Durante a coleta fracionada, os primeiros jatos do ejaculado eram descartados para em seguida, proceder-se à coleta dos primeiros 15 mL da FRE em espermatozoides (P1). Assim que o volume de 15 mL era alcançado e a coleta da P1 terminava, trocava-se o tubo Falcon por outro recipiente para coletar o restante do ejaculado. Para tal, era utilizado um copo plástico descartável de 500 mL, devidamente protegido por copo isotérmico para minimizar a ocorrência de choque térmico nos espermatozoides. Esta fração do ejaculado não era utilizada para o processamento das doses dos experimentos em questão, sendo então utilizada para a preparação de doses a serem utilizadas na rotina da central de inseminação artificial da granja.

Após a coleta, o sêmen do primeiro macho da dupla era imediatamente levado ao laboratório e colocado em banho-maria, mantido a 36°C. A seguir foram realizadas as avaliações das características físicas (motilidade, vigor e concentração) de cada macho.

O sêmen do primeiro macho (M1) era, então, pré-diluído em 30 mL do diluidor GGO (Foote, 2002) utilizando-se um béquer que era acondicionado no banho-maria a 36°C de forma a aguardar os outros 15 mL de sêmen do segundo macho (M2) da dupla. Terminada a segunda coleta, submetia-se o sêmen ao mesmo processamento do M1. Assim, após as avaliações e a coleta das amostras, estes 15 mL eram vertidos no béquer com 30 mL de diluidor e os 15 mL de sêmen do primeiro

macho, devidamente homogeneizadas. Desta forma, ao final da coleta de cada dupla de varrões, havia no béquer 30 mL de sêmen (M1 + M2) diluído em 30 mL do diluidor GGO (Foote, 2002), obedecendo-se à uma pré-diluição final 1:1 (sêmen:diluidor).

Em seguida à pré-diluição, coletou-se uma amostra para concentração, de modo que a concentração a ser utilizada para os procedimentos a seguir originava-se do sêmen heterospérmico pré-diluído. Esta contagem era realizada imediatamente após a coleta do segundo macho e a pré-diluição final, para que as doses de cada tratamento fossem preparadas rapidamente e armazenadas no contêiner. Neste momento, retiraram-se alíquotas do sêmen de ambos os machos, que eram devidamente diluídas em formol-salina tamponada e mantidas em microtubos para posterior avaliação da morfologia espermática.

Em todas as coletas registravam-se em fichas próprias (Item 8.1) os seguintes dados: número dos machos, raça, data e horário da coleta, volume, cor e aspecto do sêmen, motilidade e vigor do sêmen heterospérmico pré-diluído e diluído pré-resfriamento (0 hora), a concentração do sêmen heterospérmico e finalmente o horário do resfriamento.

3.3.2.1. Avaliação física do sêmen

Após a coleta, o sêmen foi imediatamente levado ao laboratório para processamento. A primeira avaliação compunha-se da observação visual do aspecto e coloração da P1, utilizando-se uma classificação que variava de soroso a leitoso, passando pelo branco-leitoso. O volume do sêmen era conferido de acordo com a graduação do tubo falcon para 15 mL.

A avaliação da motilidade e do vigor foram realizadas em microscópio óptico de campo claro com aumento de 100x e 400x. Para tal, uma gota de sêmen foi colocada, com auxílio de um tubo capilar previamente aquecido, entre lâmina e lamínula previamente aquecidas em placa aquecedora mantida a 37°C. A motilidade foi expressa em percentual de células móveis/campo (0-100%). Para avaliação do vigor espermático utilizou-se uma escala subjetiva de 0 a 5, baseando-se na velocidade de deslocamento das células espermáticas nos campos avaliados, de modo que as células imóveis receberam classificação 0 e as que apresentavam velocidade máxima, classificação 5.

Em todas as amostras foram avaliadas a presença ou não de aglutinações, sendo para tal utilizada uma escala de 0 a 3. Assim, atribuiu-se um valor de 0 para a 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, realizadas posteriormente, foram retiradas amostras de sêmen devidamente acondicionadas em solução formol – salina tamponada. Todas as avaliações de morfologia espermática 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 constou da observação morfológica de 100 células espermáticas (Shiple, 1999), localizadas ao longo de toda a lâmina, em diversos campos, para a determinação da percentagem de espermatozoides normais e com patologias de cabeça, de peça intermediária, cauda, acrossoma, gota proximal, gota distal e defeitos totais (Manual do CBRA, 1998).

3.3.2.2. Processamento do sêmen

armazenada em frascos plásticos de dois litros hermeticamente fechados e mantidos à temperatura ambiente protegidos da luz.

3.3.2.2.1. Diluidor utilizado

O diluidor utilizado foi o glicina-gema de ovo - GGO, descrito por Foote em 2002, sendo a sua composição descrita na tabela 9.

No momento da preparação do diluidor, o volume de água necessário era colocado em erlenmeyer de vidro previamente esterilizado e mantido em banho - maria, a 37°C. Um termômetro apropriado era colocado na água do diluidor para controlar sua temperatura, de modo que os seus componentes só eram colocados nesta água quando a mesma atingia 36°C, de modo a favorecer a dissolução dos mesmos (Figura 3.1).

3.3.2.2.2. Preparo do diluidor

Para a preparação do diluidor, utilizou-se água MiliQ (água tipo I), autoclavada e

Tabela 9: Composição do diluidor glicina – gema de ovo (Foote, 2002)

Componentes do diluidor Glicina - Gema de Ovo	
Glicose Anidra (g)	10,0
Citrato de Sódio (g)	3,3
Glicina (g)	3,3
Penicilina (UI)	1.000.000
Estreptomicina (g)	1,0
Gema de ovo (mL)	200
Água MQ (mL)	800
pH	6,82
Osmolaridade	217

Fonte: Adaptado de Foote, 2002.

Os ingredientes foram previamente pesados em balança digital analítica, com exceção da penicilina. Em seguida, quando o volume de diluidor a ser preparado era de um litro, adicionava-se aos componentes, 800 mL de água q.s.p., além do volume de penicilina correspondente à concentração de 1.000.000 UI (solução inicial).

A solução inicial era preparada com no mínimo uma hora de antecedência à dissolução da gema de ovo, para que ocorresse sua estabilização. Durante este período, permanecia em recipiente tampado e protegido da exposição à luz, em banho-maria a 37°C.

Finalmente, após a completa homogeneização e dissolução dos componentes do diluidor, o erlenmeyer era então retirado do banho – maria até que a solução inicial alcançasse temperatura de 26°C, que era controlada com auxílio de termômetro devidamente esterilizado mantido em seu interior, quando então adicionava-se 200 mL de gema de ovo para um litro do diluidor.

Nas ocasiões em que não houvesse necessidade de preparação de um litro de diluidor, os ingredientes eram pesados em quantidade proporcional ao volume desejado naquele momento. Da mesma

forma, o volume de gema de ovo a ser adicionado era sempre proporcional (20%) ao volume final de diluidor preparado (200 mL de gema de ovo + 800 mL da solução inicial = 1 litro de diluidor).

Para a obtenção da gema de ovo, foram utilizados ovos de galinha frescos, com um a quatro dias pós-postura, no máximo. Os ovos foram sempre lavados com sabão neutro em água corrente, sendo posteriormente desinfetados com algodão e álcool 70%, visando-se reduzir a contaminação do diluidor.

Para a separação da gema, os ovos eram quebrados visando-se, inicialmente, a eliminação da clara. Em seguida, a gema era cuidadosamente transferida para um filtro de papel circular e descartável, de 11 cm de diâmetro. A gema era transferida de um filtro para outro até que se encontrasse completamente seca, ou seja, quando não houvesse mais resíduos de clara. Quando a gema apresentava-se seca, sua película era rompida com auxílio do filtro, quando foi então vertida em uma proveta de vidro calibrada e previamente esterilizada. Durante esse procedimento, a película de proteção da gema era descartada, permanecendo no filtro. Tal procedimento era realizado até que o volume de gema necessário fosse conseguido (Figuras 3.2 e 3.3).

Nas ocasiões em que a gema rompia-se antes da completa retirada da clara, esta era descartada para prevenir a contaminação do diluidor com a clara.

É importante ressaltar que a separação da gema, assim como toda a preparação do diluidor, foi realizada em local limpo e seco. Assim, no momento da separação da gema, antes da disposição dos filtros de papel no balcão do laboratório, este era lavado com água e sabão neutro, seco e desinfetado com álcool 70%.

Após a separação da gema de ovo adicionava-se a mesma à solução inicial, à

uma temperatura de 26°C e, suavemente, homogeneizava-se a mistura com auxílio de bastão de vidro estéril, até dissolvê-la completamente (Figuras 3.4 e 3.5).

Finalmente, realizava-se a avaliação do diluidor pronto, colocando-se uma gota entre lâmina e lamínula, em microscópio óptico com aumento de 100x. Pretendia-se, neste momento, que o diluidor apresentasse dissolução completa dos glóbulos de gordura da gema de ovo.

Após a dissolução da gema na solução inicial, o erlenmeyer era novamente levado ao banho-maria a 36°C, sendo um termômetro adequado e devidamente esterilizado colocado no diluidor para o controle da temperatura. Antes das coletas de sêmen, colocava-se o diluidor em frascos plásticos com capacidade para 100 mL utilizados para as inseminações (T1 e T2), de forma que após a coleta e cálculo do volume de sêmen a ser utilizado por dose inseminante, o intervalo até a colocação das doses no contêiner fosse reduzido. Um volume de 30 mL de diluidor era também colocado em béquer, e mantido em banho-maria para a pré-diluição do sêmen coletado.

A preparação do diluidor para a rediluição da bisnaga com sêmen hiperconcentrado com 15 bilhões de espermatozoides (Experimento 1), ou com 24 bilhões (Experimento 2) para doses padrão de 100 mL, com 3 bilhões era feita seguindo o mesmo protocolo. No entanto, após a dissolução da gema na solução inicial a 26°C e avaliação do diluidor, colocava-se o mesmo no balcão refrigerador ligado e programado para 4,3°C, nele permanecendo até que a temperatura do diluidor fosse similar à temperatura do sêmen armazenado no contêiner, ou seja, 5°C. O diluidor era preparado pouco tempo antes do seu uso, inclusive para a rediluição, a ser realizada após 12 horas de armazenamento da dose hiperconcentrada no contêiner.

3.3.2.2.3. Diluição do sêmen

Para a diluição do sêmen e preparação do número de doses a serem produzidas por ejaculado, considerou-se a concentração espermática por mL, obtida pela contagem em câmara de Neubauer. Este valor era multiplicado pelo volume total da pré-diluição, ou seja 60 mL (30 mL do diluidor + 30 mL de sêmen) para a determinação do número de espermatozoides totais por ejaculado. Finalmente, multiplicava-se este número pela motilidade encontrada no sêmen pré-diluído, visando-se determinar o número de espermatozoides totais móveis e o número de espermatozoides móveis/mL.

Para a contagem na câmara de Neubauer, utilizou-se uma amostra de 10 µL do sêmen heterospérmico pré-diluído, diluída em 10 mL de formol-salina, à uma taxa de diluição de 1:1000.

Nos experimentos E1T1-15B e E2T1-24B, realizaram-se a preparação de doses superconcentradas com 15 ou 24 x 10⁹ de espermatozoides móveis/dose, respectivamente. Assim, para a determinação do volume de sêmen necessário para os dois tratamentos, após a contagem na câmara e determinação do número de espermatozoides móveis/mL, o volume a ser retirado dos 60 mL para produzir doses de 15 ou de 24 bilhões de espermatozoides era calculado.

Tanto as bisnagas dos tratamentos E1T1-15B e E2T1-24B (15 ou 24 x 10⁹ espermatozoides móveis), quanto as dos tratamentos E1T2-3B e E2T2-3B (3 x 10⁹ espermatozoides móveis) eram mantidas em banho-maria com volumes aproximados de diluidor, sendo de 50 mL para os dois primeiros (E1T1-15B e E2T1-24B) e de 85 mL para os dois últimos (E1T2-3B e E2T2-3B). Este procedimento visava reduzir o tempo de manipulação do sêmen fora do

contêiner, uma vez que estando o volume de cada tratamento determinado, bastava completar o volume das bisnagas para 100 mL com o diluidor GGO, após a colocação em cada uma das bisnagas do volume de sêmen diluído, necessário para produzir a dose desejada (Figura 4.1).

Após a contagem e determinação do número de espermatozoides por mL contidos nos 60 mL, determinou-se o volume a ser colocado nas bisnagas dos tratamentos E1T1-15B e E2T1-24B, como explicado anteriormente. A seguir, este volume era subtraído dos 60 mL iniciais, de forma que o volume de sêmen restante era utilizado para a preparação das bisnagas dos tratamentos E1T2-3B e E2T2-3B, que continham 3 bilhões de espermatozoides, sempre levando-se em consideração o número de espermatozoides móveis por mL. As bisnagas permaneceram em banho-maria à 36°C durante todo o processamento, sendo o sêmen diluído com pipetas de vidro calibradas e esterilizadas, utilizando-se auxiliador de pipetagem (Figura 4.2).

Todas as bisnagas eram previamente identificadas de acordo com o experimento e tratamento ao qual pertenciam, data da coleta e período (manhã ou tarde). Além disso, para facilitar a identificação dos tratamentos, no momento da inseminação, as bisnagas dos tratamentos E1T1-15B e E2T1-24B eram sempre fechadas com tampa azul, sendo as bisnagas dos E1T2-3B e E2T2-3B fechadas com tampa branca.

Imediatamente após a preparação das bisnagas e envase, as doses foram submetidas ao protocolo de resfriamento, incluindo a estocagem à 5°C, em contêiner especial, desenvolvido por Roner *et al.* (2006).

3.3.3. Resfriamento e armazenamento do sêmen

3.3.3.1. Contêiner utilizado e taxa de resfriamento

Para o resfriamento do sêmen utilizou-se o contêiner proposto por Roner *et al.*, (2006), desenvolvido especialmente para o resfriamento e conservação do sêmen suíno. O contêiner foi desenvolvido de modo a propiciar curva de resfriamento controlada para temperaturas de 5°C ou 17°C, ao mesmo tempo. No entanto, apenas a temperatura de 5°C foi utilizada neste experimento.

O contêiner é constituído por três blocos de isopor: um bloco compacto de 5 cm formando o fundo; um bloco central de 22 cm, com perfurações para colocação dos blocos menores, onde são colocadas as bisnagas plásticas que acondicionam o sêmen diluído a ser resfriado, e ainda uma perfuração central que condiciona o sistema refrigerador, havendo ainda, um bloco compacto de 6 cm com função de tampa. O bloco central do contêiner, formado de seis blocos menores, possui perfurações laterais para a colocação das bisnagas plásticas, que se movimentam em torno do bloco central, permitindo atingir a temperatura de $5^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Cada bloco comporta duas bisnagas de 100 mL, totalizando 12 bisnagas por contêiner.

De acordo com Roner *et al.* (2006), baseando-se nas curvas de resfriamento realizadas durante o desenvolvimento do contêiner, ficou estabelecida a distância de 5,5 cm do sistema refrigerador para os blocos menores contendo as bisnagas, quando a temperatura desejada for de $17 \pm 1^{\circ}\text{C}$, e de 1 cm para a temperatura de $5 \pm 1^{\circ}\text{C}$, usada neste experimento.

As aberturas laterais dos blocos menores permitem a ocorrência de troca de calor/frio

entre as bisnagas e o sistema refrigerador, obtendo-se taxas de resfriamento controladas. Desta forma, a perfuração central do contêiner, onde o sistema refrigerador é colocado, comunica-se com as paredes laterais das bisnagas por uma abertura de 4 cm. No presente trabalho, essa comunicação estendeu-se por um período de 4 horas, para o resfriamento a 5°C, diferentemente do tempo descrito por Roner *et al.* (2006), de apenas duas horas, independentemente da temperatura final desejada. Esta mudança quanto ao tempo de comunicação das bisnagas com o sistema refrigerador foi previamente utilizada por Alkmin (2010) e por Siqueira *et al.* (2011), com resultados de fertilidade aceitáveis.

O sistema refrigerador do contêiner é constituído por um cilindro fechado nas suas extremidades, confeccionado a partir de uma liga de latão/alumínio. Este cilindro foi revestido por tela de arame, com função de manter o contato homogêneo das bisnagas com o sistema refrigerador. O interior do cilindro foi preenchido com aproximadamente 1,6 L de qualquer gelo reciclável e mantido em “freezer” por no mínimo 12 horas antes do seu uso.

Para a temperatura final de 5°C, o tempo previsto é de $906,40 \pm 70,48$ minutos (15,11 horas). A taxa de resfriamento inicial de 37°C para 17°C é de $-0,16^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$, até a temperatura de 17°C; e de $-0,17^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ até 5°C, sendo importante ressaltar que para o intervalo crítico de resfriamento para o choque térmico (17°C a 8°C), a taxa de resfriamento foi de $-0,0049 \pm 0,0007^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$.

3.3.3.2. Avaliação e período de armazenamento do sêmen resfriado

A primeira avaliação do sêmen foi realizada no sêmen a fresco, imediatamente após a coleta e antes de se proceder à pré-diluição. Em seguida avaliou-se o sêmen

heterospérmico após a pré-diluição, antes da diluição final e preparação das doses de cada tratamento. No entanto, os resultados apresentados para sêmen fresco correspondem ao sêmen heterospérmico avaliado imediatamente após a pré-diluição 1:1.

Após a preparação das doses, foram realizadas avaliações seriadas do sêmen a cada 12 horas após a coleta, processamento e resfriamento. As avaliações compreenderam a mensuração da motilidade e vigor antes da colocação das bisnagas no contêiner para resfriamento, sendo esta avaliação denominada de controle (0 hora).

De acordo com o dia e horário da coleta (manhã ou tarde) as bisnagas eram identificadas, bem como o contêiner onde seriam armazenadas à 5°C. As fichas de avaliação do sêmen eram identificadas da mesma forma, visando-se facilitar a identificação dos contêineres usados para cada coleta e também para o controle das avaliações.

Para os tratamentos E1T1-15B e E2T1-24B de ambos os experimentos, a rediluição do sêmen hiperconcentrado (15 bilhões para o E1 e 24 bilhões para o E2), era realizada, em média, as 12 horas após a coleta e resfriamento. Desta forma, as doses destes tratamentos eram utilizadas para inseminação imediatamente após a rediluição para 3 bilhões de espermatozoides ou até 24 horas (36 horas após a coleta), sendo então avaliadas a cada 12 horas.

Antes das avaliações do sêmen estocado, o contêiner no qual estavam as doses a serem avaliadas naquele momento, era levado ao balcão refrigerador, previamente ligado e programado para manter uma temperatura em torno de 5°C. Desta forma, o sêmen não sofreria choque térmico quando fossem retiradas as amostras. Assim, logo após a sua abertura, uma amostra de aproximadamente 1,5 mL de sêmen diluído

foi coletada em microtubo no interior no balcão. Após a retirada da amostra, as bisnagas eram colocadas novamente no contêiner, o qual foi novamente fechado e lacrado com fita adesiva, assim permanecendo até o momento das inseminações, quando era novamente aberto para a retirada das doses inseminantes.

As amostras retiradas para avaliações foram aquecidas em banho-maria à 37°C durante 10 minutos. Em seguida, uma gota foi retirada com auxílio de tubo capilar aquecido, colocada entre lâmina e lamínula pré-aquecidas em placa aquecedora mantida a 37°C, para avaliação da motilidade e vigor espermáticos em microscópio óptico, em aumentos de 100x e 400x.

Além disso, para cada momento da avaliação, ou seja, a cada 12 horas, foram retiradas amostras de cada tratamento devidamente diluídas em solução formol-salina, para posterior avaliação morfológica dos espermatozoides.

3.3.4. Rediluição do sêmen

As rediluições das doses hiperconcentradas dos tratamentos E1T1-15B e E2T1-24B (150×10^6 spz/mL para o E1 e 240×10^6 spz/mL para o E2) foram realizadas após 12 horas de armazenamento em contêiner a 5°C. Com antecedência de cinco horas da rediluição, preparava-se o volume necessário do diluidor GGO, a ser utilizado para a rediluição. Aproximadamente 1 hora e 30 minutos antes do horário previsto para a rediluição, o mesmo era colocado no balcão refrigerador, programado para 5°C, para se evitar choque térmico. Além das bisnagas contendo o diluidor, eram colocados no balcão dois microtubos e doze pipetas de vidro calibradas e esterilizadas protegidas por papel alumínio ou por papel toalha (Figura 5.1).

No momento da rediluição, o contêiner contendo a bisnaga com o sêmen hiperconcentrado era levado ao balcão refrigerador, como citado anteriormente (item 3.3.3.2). Enfatiza-se, novamente, que o contêiner somente era aberto quando dentro do balcão, quando retirava-se uma amostra de 1,5 mL de sêmen, devidamente colocada em microtubo para a realização das avaliações físicas procedentes.

O microtubo contendo o sêmen hiperconcentrado era aquecido em banho - maria a 37°C durante 10 minutos. Com auxílio de um tubo capilar, uma gota do sêmen era colocada entre lâmina e lamínula previamente aquecidas em placa aquecedora a 37°C, e levada a microscópio óptico para avaliação da motilidade e vigor espermáticos, em aumento de 100x e 400x. Também foram coletadas amostras para avaliação da morfologia espermática, sendo uma amostra do sêmen diluída em solução formol-salina devidamente aquecida em banho - maria.

Após a avaliação do sêmen, a bisnaga era novamente retirada do contêiner no interior do balcão refrigerador (Figura 5.2), e sua temperatura aferida utilizando um termômetro devidamente esterilizado. Em seguida, a temperatura do diluidor era também conferida, uma vez que para a rediluição o sêmen e o diluidor estavam sempre à mesma temperatura. Quando do processamento do sêmen, o contêiner foi retirado do balcão, procedendo-se então à rediluição. Para tal, com o auxílio de uma pipeta de vidro de 20 mL, o sêmen era homogeneizado cuidadosamente. Em seguida, nova pipeta era utilizada para colocar o volume de semen advindo da bisnaga hiperconcentrada na bisnaga com diluidor, para que fossem preparadas as doses de 100 mL, contendo 3 bilhões de espermatozoides. Para cada dose rediluída, utilizou-se uma pipeta de vidro. À seguir, retirava-se uma amostra de 1,5 mL do sêmen rediluído, colocando-a em tubo microtubo mantido no interior do balcão.

O contêiner era novamente colocado no interior do balcão para a colocação, em seu interior, das doses recentemente rediluídas, sendo fechado novamente e lacrado com fita adesiva.

O microtubo contendo a amostra de sêmen rediluído era então levado ao banho - maria à 37°C, onde era aquecido por 10 minutos para posterior avaliação das características físicas seminais em microscópio óptico, como descrito anteriormente.

Coletou-se também, neste momento, amostra para avaliação morfológica a qual foi diluída em solução formol - salina.

Após a rediluição, as doses foram avaliadas, sendo que as não utilizadas para inseminação retornaram ao contêiner para serem utilizadas posteriormente, ou apenas submetidas às avaliações até 48 horas de resfriamento.

3.4. Procedimentos relacionados às fêmeas

3.4.1. Manejo nutricional e reprodutivo das fêmeas durante o período experimental

As fêmeas selecionadas para o experimento foram inspecionadas ainda na maternidade três dias antes da desmama, onde foram avaliadas para escore da condição corporal e condições clínicas gerais. Foram então anotados os números dos brincos e a tatuagem de cada fêmea, sendo utilizadas apenas as fêmeas DB25[®] de primeira ordem de parto.

No momento da seleção das fêmeas, estas foram marcadas com um T (teste) na região dorsal. Além disso, nas fichas individuais das matrizes era anotado o dia da desmama e o experimento em que seriam utilizadas, visando-se facilitar a sua identificação posterior pelos funcionários da maternidade e da gestação. Desta forma, todas as fêmeas

marcadas e devidamente acompanhadas pelas fichas individuais eram mantidas em grupo para facilitar o manejo de rufiação pós-desmame e posterior inseminação (Figura 6.1).

O desmame das fêmeas ocorreu em média aos 21 dias de lactação, sendo o mesmo realizado em lotes, sempre às segundas, quintas e sábados, pela manhã, aproximadamente às 6:30 horas.

No período caracterizado como intervalo desmama-cio (IDC) as fêmeas eram alojadas no galpão de pré-gestação, onde recebiam ração de lactação à vontade. As fêmeas que apresentavam cio eram então levadas aos galpões de gestação onde passavam a receber 2,0 kg de ração de lactação medicada, uma vez por dia, até 14 dias após cobertura. As especificações nutricionais de cada ração fornecida estão apresentadas nas tabelas 10,11 e 12.

Tabela 10: Teores nutricionais da ração fornecida às fêmeas gestantes até os 75 dias de gestação

Constituintes da ração da gestação	Teores
Proteína (%)	16,2441
Energia Metabolizável (kcal/kg)	2831,2924
Fibra Bruta (%)	5,7065
Cálcio Disponível (%)	1,0000
Fósforo Total (%)	0,8140
Fósforo Disponível (%)	0,5700
Extrato Etéreo (%)	3,2120

Fonte: GPD Consultoria (Empresa de consultoria que presta assistência à fazenda Miunça no que concerne a nutrição dos animais. Dados de manejo da granja).

Tabela 11: Teores nutricionais da ração fornecida às fêmeas gestantes a partir dos 76 dias de gestação

Constituintes da ração da lactação	Teores
Proteína (%)	18,6630
Energia Metabolizável (kcal/kg)	3405,0000
Fibra Bruta (%)	3,3392
Cálcio Disponível (%)	1,0000
Fósforo Total (%)	0,6037
Fósforo Disponível (%)	0,5000
Extrato Etéreo (%)	5,1829

Fonte: GPD Consultoria (Empresa de consultoria que presta assistência à fazenda Miunça no que concerne a nutrição dos animais. Dados de manejo da granja).

Tabela 12: Teores nutricionais da ração fornecida às fêmeas durante o IDC (flushing)

Constituintes da ração do flushing	Teores
Proteína (%)	18,4757
Energia Metabolizável (Kcal/Kg)	3465,0000
Fibra Bruta (%)	3,3284
Cálcio Disponível (%)	0,9000
Fósforo Total (%)	0,5500
Fósforo Disponível (%)	0,4500
Extrato Etéreo (%)	5,5205

Fonte: GPD Consultoria (Empresa de consultoria que presta assistência à fazenda Miunça no que concerne a nutrição dos animais. Dados de manejo da granja).

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

A detecção do cio foi realizada duas vezes ao dia (8:00 e 16:40), inclusive no dia do desmame, através do contato das fêmeas com um varrão adulto, sendo estimuladas pelo contato focinho-focinho com o mesmo. Concomitantemente, aplicava-se pressão sobre o dorso e o flanco da fêmea, quando avaliava-se o reflexo de tolerância ao homem, na presença do varrão. Além disso, sinais visuais como edema e hiperemia da vulva também foram avaliados.

Considerou-se como início do cio o momento em que as fêmeas permitiram ao investigador permanecer sentado sobre o seu dorso, por algum tempo, sem sinal de rejeição, como proposto por Willemse e Boender (1966).

No momento em que as fêmeas eram transferidas da maternidade para o galpão de pré-gestação, foram submetidas a um teste para detecção de cio. As fêmeas que apresentavam cio neste teste não foram utilizadas para o experimento, devido à impossibilidade de se determinar o momento real de início do estro. Desta forma, só foram utilizadas fêmeas que apresentaram no mínimo uma observação negativa de estro após serem alojadas no galpão de pré-gestação.

Para fins de cálculo da duração do estro (DE) 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. Desta forma, mesmo após a última inseminação, as fêmeas continuavam tendo o cio observado, até que não aceitassem mais a monta pelo investigador. Foi considerado como final do cio o intervalo médio entre a última aceitação da monta pelo homem na presença do varrão e a primeira não aceitação.

3.4.3. Inseminação artificial e diagnóstico de gestação

Para os dois experimentos, I e II, utilizou-se o mesmo protocolo de inseminação, descrito a seguir. Nele, as fêmeas que apresentavam cio pela manhã, foram inseminadas na noite do mesmo dia, sendo as apresentando cio a tarde inseminadas na manhã do dia seguinte. O intervalo entre as inseminações foi de aproximadamente 12 horas, até o final do cio.

Todas as inseminações foram realizadas pelo mesmo inseminador, sendo a técnica utilizada a tradicional, com deposição intracervical do sêmen. A concentração de todas as doses inseminantes foi de 3×10^9 de espermatozoides móveis, utilizando-se para as inseminações pipetas descartáveis

Goldenpig® (IMV Technologies). Os dados referentes às inseminações de todas as fêmeas foram anotados em fichas, onde constava o número das fêmeas, o tratamento ao qual pertenciam, o dia e o momento (manhã ou tarde) em que eram inseminadas, a duração das inseminações, e o número de inseminações para cada fêmea (Item 8.2).

No momento da inseminação, um ou mais rufiões foram colocados no corredor lateral do galpão, quando permaneciam diante das fêmeas visando-se estabelecer um contato naso-nasal com as mesmas e desencadeamento do reflexo de tolerância ao homem, na presença do varrão. Quando eram inseminadas mais de três fêmeas simultaneamente, dois machos eram usados para a rufiação, permanecendo separados por grades presas no corredor externo.

Após o posicionamento dos machos diante das fêmeas, uma sela de aproximadamente 10 kg era colocada no dorso de cada uma das fêmeas a ser inseminada, de modo a simular a monta do macho e estimular as mesmas. Em seguida, efetuava-se a higienização da genitália externa com papel toalha, quando a pipeta previamente lubrificada com gel (carboxi metil celulose) era introduzida no sentido dorso-cranial em direção ao cervice, até sua completa fixação (Figura 6.2).

Após a colocação das pipetas em todas as fêmeas, as bisnagas eram retiradas do contêiner e através de movimentos suaves procedia-se à homogeneização do sêmen, visando ressuspender os espermatozoides. Em seguida, as bisnagas eram acopladas às pipetas e fixadas na sela (Figura 6.3).

Para controle do tempo de cada inseminação, no momento em que as bisnagas eram acopladas às pipetas, o horário era devidamente anotado. Considerou-se como tempo de inseminação o tempo gasto para que todo o conteúdo da bisnaga fosse eliminado por gravidade,

sendo este considerado o momento final da inseminação e o horário também anotado.

Durante as inseminações, quando se detectava excesso de ar no interior das bisnagas de modo a dificultar a drenagem do sêmen, desacoplavam-se as bisnagas das pipetas, para retirada do ar, após o que estas foram rapidamente reacopladas.

Durante a realização das inseminações, procurou-se o máximo de estimulação das fêmeas, pela presença do macho, pela sela de inseminação, por pressão manual no dorso e no flanco e também por massagem vulvar suave. Além disso, durante as inseminações, as fêmeas eram observadas para presença ou não de refluxo seminal.

Ao final da inseminação, as bisnagas eram retiradas; no entanto, as pipetas permaneciam fixadas ao cervice por um tempo médio de 5 minutos, de acordo com recomendação da empresa, visando-se redução do refluxo. Passado este período, todas as pipetas eram retiradas cuidadosamente; neste momento, procedia-se à avaliação das mesmas para presença de sangue, etc. As fêmeas inseminadas permaneciam em observação após a retirada das pipetas por aproximadamente 15 minutos, para avaliação de refluxo após a inseminação.

O diagnóstico de gestação foi feito utilizando-se rufiação de retorno ao cio, do 17º dia após a inseminação até o 30º dia, observando-se o reflexo de tolerância ao homem na presença do macho, edema e hiperemia vulvar; assim como descrito anteriormente para o diagnóstico de cio.

3.4.4. Eficiência reprodutiva

As fêmeas foram acompanhadas até o parto, sendo anotados eventuais correntos, abortos, mortes ou descartes involuntários. Foram avaliadas a taxa de gestação através do acompanhamento do não retorno ao cio,

a taxa de parto, bem como o número de leitões nascidos, nascidos vivos, natimortos e mumificados.

3.5. Análises estatísticas

O delineamento experimental foi o inteiramente ao acaso, sendo as fêmeas distribuídas nos tratamentos por sorteio. Os dados proporcionais, como taxa de gestação, taxa de mortalidade, taxa de repetição de cio e taxa de parto, foram avaliados por distribuição de frequência e aplicado o teste de Qui-quadrado (χ^2), para a detecção de eventuais diferenças entre as variáveis avaliadas. Os dados quantitativos (IDC, DE, intervalos do início do cio à 1^a, 2^a, 3^a e 4^a I.A., intervalos da colheita do sêmen à 1^a, 2^a, 3^a e 4^a I.A., intervalo da última I.A. ao final do cio, número de I.As, 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.

Os dados referentes às características físicas do sêmen e o desempenho reprodutivo foram analisados e comparados pelo teste *t* de Student. Quando necessário, os dados sofreram transformação (arcsen V%). As características avaliadas subjetivamente, como o vigor espermático, foram analisados pela abordagem não-paramétrica, aplicando-se o teste de Wilcoxon.

Todas as análises foram processadas pelo programa estatístico SAS (Statistical..., 1999), sendo o nível de significância adotado de 95% ($p < 0,05$), e os dados apresentados como média \pm erro padrão da média.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. EXPERIMENTO I: Efeito da hiperconcentração de doses seminais heterospérmicas (15 bilhões de espermatozoides por dose de 100 mL) rediluídas após 12 horas de armazenamento a 5°C sobre as características físicas do sêmen avaliado a fresco, pós diluído e pós rediluição para doses padrão (3 bilhões/100 mL) e armazenadas por 12, 24 e 36 horas após a coleta e sobre a fertilidade de fêmeas suínas inseminadas

4.1.1. Características físicas do sêmen e desempenho reprodutivo dos varrões

No experimento I foram utilizados 24 ejaculados oriundos de nove varrões, sendo três da raça Large White e seis da raça Landrace. Na tabela 13, estão apresentados os dados referentes à distribuição da frequência de utilização dos machos no experimento 1 por tratamento. Observa-se na tabela 13 uma distribuição bastante uniforme das duplas de machos ao longo do período experimental, entre os tratamentos.

Tabela 13: Distribuição da frequência de utilização das duplas de machos no experimento 1 entre os tratamentos

Tratamentos	Duplas de Varrões									Total
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
E1T1-15B	8	5	8	1	3	5	2	3	4	39
E1T2-3B	6	3	6	2	3	6	5	2	3	36
Total	14	8	14	3	6	11	7	5	7	75

Observou-se no modelo experimental apresentado na tabela 14, a ausência ($p>0,05$) de efeito do tratamento sobre a motilidade, nos diferentes tempos de armazenamento, embora o período de armazenamento do sêmen tenha influenciado ($p<0,05$) a motilidade (tabelas 14 e 15).

Na tabela 15, estão apresentados os dados referentes ao comportamento da motilidade no experimento 1, tanto para o E1T1-15B (doses com 15 bilhões de espermatozoides móveis, rediluída para 3 bilhões após 12 horas de armazenamento à 5°C) como para o E1T2-3B (grupo controle, doses inseminantes contendo 3 bilhões de espermatozoides).

Verifica-se na tabela 15 que a motilidade espermática do sêmen a fresco, ou seja, imediatamente após a coleta e pré-diluído 1:1 (30 mL de sêmen: 30 mL de diluidor), foi similar ($p>0,05$) para os tratamentos 1 e 2, em virtude do sêmen de ambos os tratamentos originar-se dos mesmos ejaculados. Tal fato pode explicar também a similaridade ($p>0,05$) da motilidade espermática entre os dois tratamentos no tempo 0h, correspondente ao momento quando as doses hiperconcentradas (E1T1-15B) e padrão (E1T2-3B) foram preparadas ($81,82\pm 1,50\%$ vs $80,91\pm 1,50\%$, $p>0,05$), antes do resfriamento do sêmen no contêiner.

Tabela 14: Valores de p para os tratamentos, período de armazenamento e interação tratamento x período de armazenamento para a motilidade do sêmen

Fontes de Variação	Nível de significância (valor de p)
Tratamentos	0,8292
Período de armazenamento	0,0001
Tratamento x Período de armazenamento	0,9617

Os resultados de motilidade observados no presente experimento, aproximam-se dos relatados por Saravia *et al.* (2008), de 86,2% para o sêmen da P1, considerada

pelo autor como os primeiros 10mL da fração rica, após a coleta e diluição no diluidor BTS.

Tabela 15: Comportamento da motilidade espermática do sêmen diluído, resfriado a 5°C e armazenado em contêiner especial, oriundo de doses heterospérmicas hiperconcentradas (15×10^9 espermatozoides/dose), antes e após a rediluição para doses padrão ou de doses heterospérmicas padrão (3×10^9 espermatozoides/dose), avaliadas em diferentes períodos após a coleta do sêmen

Tratamentos	Períodos de avaliação					
	Fresco	Zero horas	12 horas	Rediluição	24 horas	36 horas
E1T1-15B (%)	82,27 ± 1,50	81,82 ± 1,50	73,64 ± 1,50	73,64 ± 1,50	71,82 ± 1,50	70,71 ± 1,88
E1T2-3B (%)	82,27 ± 1,50	80,91 ± 1,50	75,00 ± 1,50	—	72,27 ± 1,50	70,71 ± 1,88
Total (%)	82,27 ± 1,04 ^a	81,36 ± 1,04 ^a	74,32 ± 1,04 ^b	73,73 ± 1,55 ^b	72,05 ± 1,04 ^b	70,71 ± 1,31 ^b

^{a,b} Médias acompanhadas na linha por letras diferentes, diferem entre si ($p < 0,05$)

Por outro lado, Alkmin (2010) trabalhando também com a coleta fracionada, envolvendo os primeiros 15 mL da fração rica (P1), observou uma motilidade de $74,5 \pm 1,17\%$ para o sêmen a fresco, oriundo desta fração do ejaculado, sendo este valor numericamente inferior ao observado no presente experimento. Quando comparou a motilidade espermática da P1 do ejaculado com a observada no restante do ejaculado, Alkmin (2010) observou sempre os menores valores de motilidade para a P1, embora não tenha havido diferenças ($p > 0,05$) entre elas quanto às taxas de parto e características das leitegadas. No entanto, em um trabalho conduzido por Rodriguez-Martinez *et al.* (2005), os valores de motilidade encontrados na P1, após a coleta e resfriamento à 15°C, acompanhada por resfriamento a 5°C e após o descongelamento, foram sempre superiores aos observados no restante do ejaculado (P2).

Observou-se uma queda acentuada ($p < 0,05$) da motilidade, quando avaliada às 12 horas de armazenamento, em relação à observada no sêmen a fresco e no sêmen 0h, para ambos os tratamentos ($74,32 \pm 1,04\%$ – Tabela 15). Do mesmo modo, Siqueira (2011) trabalhando com doses hiperconcentradas (6, 9 ou 12 bilhões), oriundas do ejaculado total, diluídas em GGO e resfriadas à 5°C, observou uma queda da motilidade ($p < 0,05$), após 12

horas de armazenamento. No trabalho de Siqueira (2011), o valor de motilidade às 12 horas de armazenamento, para as doses contendo 3, 6 ou 9 bilhões, foi de $76,25 \pm 2,18\%$, sendo que para as doses contendo 12 bilhões, a motilidade foi de $73,33 \pm 1,41\%$. Todos estes valores aproximam-se dos observados no presente experimento, para o mesmo tempo de avaliação (12 horas). Segundo a autora, a rediluição do sêmen após 12 horas de armazenamento, mesmo nas doses com concentração de até 12×10^9 de espermatozoides/dose pré-rediluição pode ser utilizada e ainda manter uma boa qualidade seminal, por até 60 horas de armazenamento após a coleta do sêmen.

Entretanto, Alkmin (2010) observou uma redução da motilidade no tempo 0h em relação à verificada no sêmen a fresco ($74,50 \pm 1,17\%$ vs $64,50 \pm 2,61\%$), quando o sêmen foi diluído no diluidor GGO (Foote, 2002). Ao contrário do que observou-se no presente experimento, Alkmin (2010) verificou uma queda contínua e significativa ($p < 0,05$) da motilidade ao longo das 72 horas de armazenamento, para um valor de $30,50 \pm 2,61\%$. Já às 36 horas de armazenamento, a motilidade foi de $55,00 \pm 2,61\%$, inferior ($p < 0,05$) a 60%, valor bem menor ao encontrado para o mesmo período de armazenamento, no presente experimento de $70,71 \pm 1,31\%$ (tabela 15).

Os resultados encontrados por Saravia *et al.* (2008) para o sêmen resfriado à 5°C e diluído em diluidor de lactose-gema de ovo e glicerol foram superiores aos aqui descritos (91,6% vs 74,32%), embora deva ser ressaltado que o tempo de armazenamento do sêmen à 5°C foi superior no presente experimento, o que em si poderia explicar a menor motilidade observada.

Como as avaliações de motilidade, no presente experimento, e no trabalho de Alkmin (2010) foram realizadas de forma subjetiva, diferenças de motilidade espermática, observadas entre os dois trabalhos, podem ser oriundas da variação individual existente entre os avaliadores, ou ainda da variação existente entre machos, que diferem quanto à sensibilidade de suas células espermáticas para suportar desafios como o armazenamento do sêmen hiperconcentrado, à 5°C, por prolongados períodos. Vale salientar, ainda, o maior número de varrões e de ejaculados utilizados no presente experimento. No entanto, para ambos os experimentos, os valores acima de 70% estão de acordo com o descrito por Rozeboom (2000) para o ejaculado normal do varrão. Além disso, Flowers (1997) afirmou que só há prejuízo ao desempenho reprodutivo dos varrões quando a motilidade é inferior a 60%.

Desta forma, os dados referentes ao experimento de Alkmin (2010), bem como os do presente experimento se somam aos de vários trabalhos na espécie suína, todos sugerindo que os espermatozoides oriundos da primeira porção (10-15mL) da fração rica em espermatozoides, são aqueles que melhor sobrevivem à manipulação do sêmen (Sélles *et al.*, 2001; Peña *et al.*, 2003; Peña *et al.*, 2004a). Além disso, Rodriguez-Martínez *et al.* (2005) afirmaram que os espermatozoides oriundos da primeira porção da fração rica (primeiros 10mL) devem ser considerados, dentre toda a população de espermatozoides do ejaculado, como os que primeiro

colonizarão o reservatório espermático na tuba uterina em porcas, sendo portanto, aqueles que principalmente e potencialmente estarão envolvidos na fertilização.

Com relação ao vigor (tabela 16), o sêmen a fresco apresentou o mesmo resultado para ambos os tratamentos (3,45±0,15), uma vez que, como explicado anteriormente, os dois tratamentos foram oriundos dos mesmos ejaculados. Ao trabalhar com a fração rica do ejaculado, notadamente com os primeiros 15 mL, Alkmin (2010) observou vigor médio de 4,70±0,11 para o sêmen a fresco da P1, valor superior ao encontrado no presente experimento.

As avaliações de motilidade e vigor no sêmen a fresco heterospérmico (dois machos) foram realizadas, no presente experimento, imediatamente após a pré-diluição em diluidor glicina-gema de ovo (Foote, 2002). Ao contrário, as avaliações do sêmen a fresco, no trabalho de Alkmin (2010) envolveram o sêmen *in natura*, o que pode explicar, de certa forma, as diferenças observadas entre os dois experimentos.

Observou-se que o vigor espermático foi influenciado ($p<0,05$) pelo tratamento e pelo período de armazenamento. Entretanto, observou-se efeito do tratamento ($p<0,05$) apenas no tempo 0 horas (tabela 16), quando os valores observados no E1T1-15B superaram ($p<0,05$) os do E1T2-3B, quanto ao vigor espermático.

Os valores de vigor foram mantidos, sem alterações significativas ($p>0,05$) nas primeiras 12 horas de armazenamento, nos dois tratamentos (tabela 16). Às 24 horas de armazenamento, os valores de vigor espermático diferiram ($p<0,05$) dos observados no tempo 0 horas, para o E1T1-15B, diferenças que persistiram até as 36 horas, embora os valores tenham sido similares ($p>0,05$) da rediluição até as 36 horas. Ainda com relação ao E1T1-15B, observou-se que o único valor a diferir

($p < 0,05$) do sêmen a fresco, foi observado quando da avaliação às 36 horas de

armazenamento.

Tabela 16: Comportamento do vigor espermático no sêmen diluído, resfriado à 5°C e armazenado em contêiner especial, oriundo de doses heterospérmicas hiperconcentradas (15×10^9 de espermatozoides/dose), antes e após a rediluição para doses padrão ou de doses heterospérmicas padrão (3×10^9 de espermatozoides/dose) avaliadas à diferentes períodos de tempo após a coleta

Tratamentos	Períodos de avaliação					
	Fresco	Zero horas	12 horas	Rediluição	24 horas	36 horas
E1T1-15B	3,45 ± 0,15 ^{abA}	3,73 ± 0,15 ^{aA}	3,50 ± 0,15 ^{abA}	3,32 ± 0,15 ^{abc}	3,23 ± 0,15 ^{bcA}	3,00 ± 0,19 ^{cA}
E1T2-3B	3,45 ± 0,15 ^{aA}	3,23 ± 0,15 ^{abB}	3,36 ± 0,15 ^{aA}	—	2,91 ± 0,15 ^{cA}	2,71 ± 0,19 ^{bcA}
Total	3,45 ± 0,11	3,48 ± 0,11	3,43 ± 0,11	3,32 ± 0,15	3,07 ± 0,11	2,86 ± 0,13

^{a,b} Médias acompanhadas na linha por letras diferentes, diferem entre si ($p < 0,05$)

^{A,B} Médias acompanhadas na coluna por letras diferentes, diferem entre si ($p < 0,05$)

Além disso, o vigor espermático foi menor ($p < 0,05$) às 24 horas em relação ao tempo 0h para os dois tratamentos. Entretanto, apenas no T2 diferiu ($p < 0,05$) do observado no sêmen a fresco, sendo que esta diferença persistiu quando da avaliação às 36 horas de armazenamento.

De uma maneira geral, observou-se uma queda progressiva do vigor espermático, nos dois tratamentos, ao longo do período de armazenamento de 36 horas, embora nem sempre as diferenças fossem significativas.

Em um trabalho conduzido por Alkmin (2010), observou-se também uma queda ($p < 0,05$) do vigor espermático após 24 horas de armazenamento ($3,55 \pm 0,15$), em relação ao tempo zero horas ($3,75 \pm 0,15$).

Observou-se que para o E1T1-15B a rediluição não causou uma redução significativa do vigor, de forma que os valores observados para o sêmen pré-rediluição (hiperconcentrado) não diferiram ($p > 0,05$) dos observados após a rediluição, quando produziu-se as doses padrão, com 3×10^9 de espermatozoides por dose.

Ao trabalhar com doses hiperconcentradas (6, 9 ou 12 bilhões de espermatozoides por dose), oriundas do ejaculado total, Siqueira

(2011) também observou uma queda do vigor, após 24 horas de armazenamento à 5°C, para as doses de 6 e 9 bilhões ($4,25 \pm 0,17$ para ambos os tratamentos), e após às 36 horas de armazenamento, para as doses contendo 12 bilhões de espermatozoides ($4,33 \pm 0,12$). No presente experimento, as doses oriundas do sêmen hiperconcentrado (E1T1-15B) não apresentaram redução significativa ($p > 0,05$) do vigor às 36 horas, em relação às 24 horas.

De acordo com Silveira e Lais (1999) somente o sêmen apresentando vigor mínimo de três, é capaz de manter a sua capacidade fecundante. No presente experimento, os dois tratamentos mantiveram valores superiores a 3 até às 12 horas de armazenamento, que foram mantidos no E1T1-15B, sempre superiores a 3, até as 36 horas de armazenamento.

A queda da motilidade e do vigor no decorrer do período de estocagem resulta do envelhecimento *in vitro* dos espermatozoides (Johnson *et al.*, 2000), independentemente do tipo de diluidor utilizado, não havendo, até o presente momento, como impedir a ocorrência deste fenômeno. Entretanto, o armazenamento a baixas temperaturas, como à 5°C, provoca

uma redução da atividade metabólica e, conseqüentemente, da liberação de catabólitos que podem contribuir para a redução da viabilidade espermática. Além disso, a utilização de diluidores adequados, que conferem maior proteção à membrana espermática, aditivamente a uma adequada ação antioxidante e tamponante, ajudam na manutenção da viabilidade dos espermatozoides, por um maior período de estocagem.

De acordo com Polge (1956a), o ponto crítico para a estocagem do sêmen do varrão é a redução da sua capacidade fecundante, após 24 horas de armazenamento. Alexopoulos *et al.* (1996) observaram uma queda significativa da motilidade do sêmen, após 48 horas de armazenamento à 17°C. No mesmo sentido, De Ambrogi *et al.* (2006) observaram uma queda da motilidade após 96 horas de armazenamento.

Deve-se enfatizar, no entanto, que a velocidade de resfriamento, principalmente quando do resfriamento de 20°C para 5°C, também deve ser considerada. Weber (1989) obteve percentuais de motilidade, inferiores à 20%, quando submeteu o sêmen à um resfriamento direto para 5°C. No mesmo contexto, Foote (2002) observou que ao resfriar o sêmen até 5° em 4h, houve uma redução subsequente do número de leitões nascidos. No presente experimento e no conduzido por Alkmin (2010), o contêiner utilizado possibilitou uma curva de resfriamento lenta (Roner *et al.*, 2006) de -0,18°C/min (37°C a 17°C); de -0,0049°C/min (17°C a 8°C) e de -0,0066°C/min (8°C a 5,38°C). De acordo com Crowell (2009), taxas de resfriamento rápidas apresentaram os piores resultados para o sêmen suíno.

Na tabela 17 estão apresentadas as características espermáticas inerentes à P1 (primeiros 15 mL) da fração rica do

ejaculado heterospermico oriundo de dois varrões submetidos à coleta fracionada.

Com relação ao número de espermatozoides totais (tabela 17) da P1 (primeiros 15 mL), o valor encontrado foi de 38,86±1,81 (média ± erro padrão) bilhões, sendo de 32,02±1,76 bilhões de espermatozoides móveis. Alkmin (2010), trabalhando com 10 ejaculados de cinco varrões encontrou uma concentração média de 25,38±2,77 bilhões de espermatozoides totais por varrão, avaliados individualmente. No mesmo sentido, Saravia *et al.* (2010) relataram uma concentração média de 16 bilhões para os primeiros 10 mL da fração rica, ou seja, em ambos os trabalhos observou-se uma concentração inferior à obtida no presente experimento. Vale salientar, no entanto, que as concentrações obtidas no presente trabalho, envolveram a somatória de duas P1, oriundas de dois varrões, enquanto Alkmin (2010) e Saravia *et al.* (2010) avaliaram o sêmen de varrões, coletados individualmente.

Vários fatores podem influenciar a concentração espermática de um ejaculado, dentre eles podendo-se citar a raça (Kommisrud *et al.*, 2002), o volume do ejaculado (Kondracki, 2003), existindo também grande variação individual, dentro de uma mesma raça (Johnson *et al.*, 2000). Além disso, a frequência de coletas tem efeito significativo sobre o volume e a concentração de espermatozoides (Smital, 2009). Falkenberg *et al.* (1992), citado por Smital (2009) observaram que o número máximo potencial de espermatozoides de um macho pode ser coletado se os varrões forem submetidos à coletas a cada 2-5 dias. A produção espermática também é influenciada pela idade do animal, sendo ótima ao final do crescimento corporal, aos 2,5-3,0 anos de idade (Falkenberg *et al.*, 1992; citado por Smital, 2009).

Tabela 17: Características espermáticas da porção um (primeiros 15mL) do sêmen heterospérmico oriundo de dois varrões submetidos à coleta fracionada, bem como o seu rendimento quanto ao número de fêmeas inseminadas

Características avaliadas	Tratamentos	
	E1T1-15B	E1T2-3B
Volume de sêmen (mL)	14,48 ± 0,82 ^a	2,89 ± 0,16 ^b
Motilidade espermática (%)	82,27 ± 1,95	82,27 ± 1,95
Espermatozoides por mL (x10 ⁶)	647,73 ± 30,14	647,73 ± 30,14
Espermatozoides móveis por mL (x10 ⁶)	533,53 ± 29,34	533,53 ± 29,34
Total de espermatozoides na fração 1 (x10 ⁹)	38,86 ± 1,81	38,86 ± 1,81
Total de espermatozoides móveis na fração 1 (x10 ⁹)	32,02 ± 1,76	32,02 ± 1,76
Número total de espermatozoides por dose (x10 ⁹)	18,31 ± 0,47 ^a	3,66 ± 0,09 ^b
Nº total de espermatozoides móveis por dose (x10 ⁹)	14,98 ± 0,05 ^a	2,99 ± 0,02 ^b
Número de doses produzidas por fração	5,00 ± 0,00 ^{**}	5,36 ± 0,06
Número real de fêmeas inseminadas	2,64 ± 0,34	2,73 ± 0,38

^{a,b} Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem entre si (p<0,05)

*Doses produzidas pelo sêmen heterospérmico oriundo dos primeiros 15 mL da fração rica de dois machos (30 mL de sêmen)

**O número de doses era fixo, por isso não há erro padrão

Não é possível comparar os três estudos com relação aos fatores acima relacionados, embora seja importante ressaltar que o intervalo médio entre coletas no presente experimento, foi de 4,5 dias (2 a 7 dias), sendo a maioria dos machos submetidos à coletas realizadas à intervalos de 3 em 3 dias. Outro importante fator a ser considerado é que apenas dois machos utilizados neste experimento tinham menos de dois anos.

Observa-se na tabela 17, que para a preparação das doses contendo 15 bilhões de espermatozoides (E1T1-15B), utilizou-se um volume médio de sêmen de 14,48±0,82 mL. Este volume foi de 2,89±0,16 mL, quando da preparação das doses com 3 bilhões de espermatozoides (E1T2-3B). Como esperado, os volumes diferiram (p<0,05) entre os tratamentos.

A taxa de diluição das doses hiperconcentradas (E1T1-15B) foi de 1:6

(sêmen:diluidor) e para as doses padrão (E1T2-3B) de 1:34 (tabela 17).

Polge (1956b), dentre outros autores, afirmou que a sobrevivência dos espermatozoides do varrão, durante o armazenamento, é influenciada pela taxa de diluição. No entanto, as opiniões são controversas a respeito da taxa de diluição ideal. De acordo com Perez Marcos *et al.* (1991) a taxa de diluição depende das características do diluidor utilizado, tais como do pH, da pressão osmótica e da sua capacidade tamponante. Normalmente, a taxa de diluição para o ejaculado total do varrão é de 1:10 (Johnson *et al.*, 2000). Assim, a taxa de diluição média para o E1T1-15B (1:6) foi inferior à proposta para o ejaculado total, o que era de se esperar, já que se tratavam de doses hiperconcentradas; mas se encontra dentro do intervalo proposto por Ruvalcaba (1994), de 1:5 até 1:15 dependendo da concentração espermática do ejaculado.

No entanto, a taxa de diluição utilizada no E1T2-3B (1:34) está bem acima dos limites indicados pela literatura. Alkmin (2010) trabalhando com doses padrão de 3 bilhões de espermatozoides, utilizou 2,76 mL de sêmen da P1 (primeiros 15 mL) para a preparação das doses de 100 mL. Desta forma, a taxa de diluição utilizada foi de 1:35 (sêmen:diluidor), quando também utilizou-se o diluidor glicina-gema de ovo; sendo os valores dos dois experimentos muito similares entre si.

Ao trabalhar, com o ejaculado total, Siqueira (2011) usou taxas de diluição de 1:10,6 para a preparação de doses contendo 3 bilhões de espermatozoides. Desta forma, nota-se que as diferenças observadas nas taxas de diluição quando da preparação de doses inseminantes, oriundas da P1 do ejaculado, em relação ao ejaculado total, se deve à alta concentração espermática/mL presente na P1; assim, o volume de sêmen necessário para a produção das doses é obviamente, inferior. Além disso, a autora hiperconcentrou o sêmen, de modo que as taxas de diluição para as doses contendo 6, 9 ou 12 bilhões/100mL foram, respectivamente, de 1:4,8; 1:2,9 e 1:1,2. Observou-se naquele trabalho, que o aumento da concentração espermática de 6 ou 9 bilhões/100 mL para 12 bilhões/100 mL não afetou a viabilidade dos espermatozoides, sendo todas as concentrações capazes de manter a viabilidade espermática por até 60 horas de armazenamento, mesmo à 5°C, quando da utilização do diluidor GGO, proposto por Foote (2002).

Segundo Weber (1989), o aumento da sensibilidade dos espermatozoides do ejaculado total ao resfriamento se deve à uma grande diluição dos componentes protetores presentes na fração espermática rica ou à um fator sensibilizante oriundo das secreções das glândulas acessórias.

O “efeito diluição” descrito por Maxwell e Johnson (1999) ocorre quando há uma

diluição excessiva das células espermáticas, levando a uma perda permanente da motilidade, da atividade metabólica e da capacidade fertilizante *in vivo*. No entanto, os autores afirmam que estes efeitos podem ser minimizados quando da utilização de diluidores contendo gema de ovo, tais como o diluidor usado nos dois experimentos citados anteriormente.

Alguns autores tem observado que quando as taxas de diluição excedem 1:15 ocorre redução da viabilidade espermática, pela ocorrência do choque osmótico. Da mesma forma, a utilização de baixas taxas de diluição, como as inferiores a 1:5, resultam em redução da viabilidade espermática devido à carência de substratos energéticos e à perda da capacidade tamponante do meio, devido ao excesso de células espermáticas/mL de diluidor e, conseqüentemente, do acúmulo de produtos tóxicos advindos do metabolismo celular (Flowers, 1996; Levis, 1997).

No entanto, Varner *et al.* (1987), trabalhando com sêmen de garanhões, observaram ser mais importante o número de células espermáticas por mL de sêmen diluído do que as taxas de diluição. Segundo os mesmos autores, este valor deve estar no intervalo de 30 a 50 milhões de espermatozoides por mL de sêmen diluído. Desta forma, observa-se que as doses do E1T1-3B (36,6 milhões/mL) obedecem a essa premissa, embora as doses do E1T1-15B (183,3 milhões/mL), tenham uma concentração 3,66 vezes acima do limite máximo indicado por estes autores, de 50×10^6 espermatozoides/mL de sêmen diluído (tabela 17).

A proposta do armazenamento do sêmen hiperconcentrado vem de longa data. Assim, Desjardins e Hafs, em 1962, propuseram a redução dos custos de armazenamento e transporte do sêmen congelado de touros, mantendo o sêmen a 5°C, após o descongelamento, por 2-3 dias. No mesmo sentido, Bratton *et al.* (1955)

sugeriram a possibilidade de se congelar o sêmen concentrado, de forma a rediluí-lo, posteriormente, para uma concentração desejada, após o descongelamento, antes das inseminações artificiais das vacas. Em 1961, Sevine obteve sucesso quanto à manutenção da motilidade, durante o armazenamento à 5°C, após o descongelamento do sêmen congelado, concentrado e rediluído. Em seguida, Desjardins e Hafs (1962) congelaram o sêmen utilizando uma concentração de 200×10^6 espermatozoides/mL em diluidor de citrato-gema de ovo, observando uma motilidade superior, em relação ao sêmen congelado a uma concentração de 20×10^6 espermatozoides/mL.

O congelamento do sêmen apresentando concentração acima das normais, acompanhado por uma rediluição subsequente após o seu descongelamento, também foi descrito por Shannon e Curson (1972). Também Macmillan *et al.* (1978) congelaram o sêmen em palhetas de 0,25 mL contendo 100×10^6 ou 450×10^6 espermatozoides/mL, ou seja, 25 ou 112,5 milhões de espermatozoides por palheta. Estas doses foram descongeladas e rediluídas para doses inseminantes de 0,5 mL, contendo 5×10^6 de espermatozoides totais. Desta forma, cada palheta congelada hiperconcentrada poderia produzir até 22 doses inseminantes ao descongelamento, o que otimizaria qualquer sistema de estocagem e/ou transporte. As taxas de gestação obtidas com o sêmen oriundo das palhetas contendo 450 milhões de espermatozoides/mL foram de 62,5%, contra 61,4% para as fêmeas inseminadas com sêmen oriundo das palhetas congeladas com 100 milhões de espermatozoides por mL, antes da rediluição.

A principal limitação, quando da utilização de doses hiperconcentradas, a serem rediluídas posteriormente, é o curto período de armazenamento das doses após a sua rediluição. Parece que este período reduzido de viabilidade espermática pode ser

explicado pela toxicidade exercida pelos espermatozoides mortos. Neste sentido, tem sido demonstrado que uma grande parte dos espermatozoides são lesados e morrem, durante o processo de resfriamento e congelamento, havendo então grande produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), mesmo à baixas temperaturas. À temperatura ambiente, os efeitos da peroxidação lipídica são ainda mais severos, embora possam ser minimizados pela redução da tensão de oxigênio e/ou pela incorporação de antioxidantes ao diluidor. Os espermatozoides do varrão são altamente susceptíveis à peroxidação lipídica, em virtude da alta proporção de fosfolípidos insaturados em sua membrana.

Desta forma, pode ser que a maior concentração de células espermáticas/mL nas doses do E1T1-15B tenha favorecido o armazenamento do sêmen pela redução do teor de oxigênio, como proposto por Windson *et al.* (1993), ao utilizar o sêmen de ovino armazenado à 1×10^8 espermatozoides/mL ou a 1×10^9 espermatozoides/mL. Em 1968, Shannon estudou o efeito do teor de oxigênio sobre a sobrevivência espermática. Para tal, utilizou ejaculados de 20 touros diluídos em diluidor citrato-gema de ovo e resfriados à 5°C, com concentrações variáveis, de 12,5 ou 200×10^6 espermatozoides/mL. De acordo com o autor, houve interação significativa entre o grau de saturação de nitrogênio (N_2), associado à redução da tensão de oxigênio, do período de estocagem do sêmen e da taxa de diluição. A saturação de N_2 com redução da tensão de oxigênio, impediu o declínio da motilidade espermática no decorrer do período de estocagem do sêmen, sendo esta proteção mais acentuada no sêmen armazenado, apresentando altas concentrações. Em 1968, Shannon propôs a utilização do diluidor CaprogenTM, apresentando em sua fórmula a gema de ovo, a catalase, além da saturação com N_2 . Este diluidor possibilitou o transporte do

sêmen hiperconcentrado de touros, à temperatura ambiente, acompanhado de armazenamento por até 4 dias, quando obteve-se taxas de não retorno ao cio de 60-70%.

Mais recentemente, Saravia (2008) congelou o sêmen suíno hiperconcentrado (2×10^9 espermatozoides/mL) em MiniFlatPacks[®] (0,5-0,7mL) e não observou diferenças quanto à motilidade e vigor, entre as doses congeladas hiperconcentradas e as do grupo controle (FlatPacks[®], 5mL). Diante dos resultados apresentados anteriormente pela literatura, pode-se afirmar que o resfriamento e até mesmo o congelamento do sêmen hiperconcentrado apresenta-se como uma alternativa viável para o armazenamento e/ou transporte do sêmen diluído, até os locais onde serão realizadas as inseminações. Vale salientar, neste momento, que sua utilização poderá proporcionar uma redução considerável dos custos, mantendo resultados aceitáveis de fertilidade.

Como pode ser observado na tabela 17, o número de doses produzidas no E1T1-15B foi invariavelmente 5, sendo o número médio produzido no E1T2-3B, de $5,36 \pm 0,06$ doses inseminantes.

Observou-se, além disso, que o número real de fêmeas inseminadas não diferiu ($p < 0,05$) entre os dois tratamentos ($2,64 \pm 0,34$ para o E1T1-15B vs $2,73 \pm 0,38$ para o E1T2-3B). No entanto, o número de fêmeas inseminadas foi inferior ao número médio de doses disponíveis. Deve-se enfatizar, diante disto, que a realização das inseminações dependeu do número de fêmeas em cio destinadas ao experimento, em um dado momento, além do número de doses disponíveis para tal. É importante esclarecer ainda, que o número médio de doses produzidas no E1T2-3B foi 5,36, ou seja, houve coletas que produziram um menor número de doses (mínimo de 2 doses). Desta forma, para não haver perda

da uniformidade entre os tratamentos, procurou-se distribuir as fêmeas de forma a manter o número de fêmeas inseminadas no E1T1-15B, bem próximo do número de fêmeas inseminadas no E1T2-3B, para todas as inseminações. Assim, observou-se uma redução do número real de fêmeas inseminadas no E1T1-15B, em relação ao número potencial de fêmeas que poderiam ter sido inseminadas (tabela 17).

4.1.2. Parâmetros de controle, fertilidade e prolificidade das fêmeas suínas inseminadas com doses seminais heterospermicas hiperconcentradas (15 bilhões de espermatozoides por dose) rediluídas após 12 horas de armazenamento a 5°C para doses padrão (3 bilhões) e de fêmeas inseminadas com doses seminais heterospermicas padrão armazenadas por 12, 24 e 36 horas após a coleta

Na tabela 18 estão apresentados os parâmetros de controle das fêmeas suínas inseminadas.

Não houve diferenças ($p > 0,05$) para o intervalo do início do cio à IA entre os tratamentos, para nenhuma inseminação (tabela 18). Desta forma, pode-se concluir que todas as fêmeas foram inseminadas em momentos similares entre os tratamentos, não constituindo esta variável uma fonte de variação a ser considerada, quando da avaliação do desempenho reprodutivo das fêmeas.

Além disso, o tempo médio da coleta do sêmen à inseminação artificial não diferiu ($p > 0,05$) entre os tratamentos, exceto ($p < 0,05$) para a segunda inseminação, quando as fêmeas de E1T2-3B foram inseminadas, aproximadamente, seis horas mais tarde que as fêmeas do E1T1-15B ($26,16 \pm 1,03$ vs $20,43 \pm 2,25$ horas).

Com relação ao intervalo entre IA's, observou-se diferenças ($p < 0,05$) entre os

tratamentos apenas na terceira inseminação. Além disso, os intervalos médios entre IA's foram similares ($p>0,05$), entre os tratamentos, para a segunda e a quarta inseminações (tabela 18).

No entanto, como demonstrado a seguir (tabela 19), estas diferenças não influenciaram os resultados de fertilidade obtidos nos dois tratamentos. Deve-se considerar que os resultados apresentados na tabela 18 são as médias gerais de todas as inseminações realizadas, referentes à 10 fêmeas para cada tratamento. As 20 fêmeas não foram inseminadas, entretanto, no mesmo momento. O número de fêmeas a serem inseminadas de cada vez dependia do número de fêmeas de primeira ordem de parto desmamadas por semana, com a mesma duração da lactação, e que se apresentavam em cio, no momento adequado para as inseminações. Além disso, o número de fêmeas inseminadas dependia diretamente do número de machos disponíveis para as coletas referentes ao experimento, por serem os mesmos também utilizados na rotina da granja.

Assim, a distribuição das fêmeas em vários grupos de inseminações, determinou uma maior variação referente aos intervalos de tempo.

Para o E1T1-15B, quando as doses foram rediluídas, antes das inseminações, o intervalo da coleta do sêmen à rediluição não diferiu ($p>0,05$) entre as inseminações, assim como o tempo decorrido entre a rediluição e as inseminações ($p>0,05$). Pode ser observado na tabela 18, que o tempo médio da rediluição às inseminações foi curto, variando de 7,91 a 14,07 horas. Como não era possível a coleta de várias duplas de machos em um mesmo momento, de modo que algumas doses permanecessem armazenadas após a rediluição por maior período, as coletas foram realizadas no decorrer dos dias das inseminações. Assim, algumas fêmeas foram inseminadas com sêmen após 0h de

rediluição, o que levou à redução do tempo médio transcorrido entre a rediluição e as inseminações.

A motilidade do sêmen não diferiu ($p>0,05$) entre os tratamentos para as inseminações, exceto na terceira inseminação, quando foi maior para o E1T2-3B ($73,50\pm 0,76\%$ vs $71,00\pm 0,67\%$; $p<0,05$). Como demonstrado na tabela 15, não houve efeito do tratamento sobre a motilidade, embora houvesse efeito do tempo de armazenamento do sêmen. Desta forma, pode ser que esta diferença se deva ao tempo de armazenamento do sêmen utilizado para a inseminação, envolvendo um determinado grupo de fêmeas, principalmente porque no E1T1-15B, como o número de doses produzidas era sempre 5, as doses podiam ser armazenadas por um maior período, em relação às doses referentes ao E1T2-3B.

No que se refere ao vigor espermático, observou-se diferenças ($p<0,05$) entre os tratamentos, apenas na segunda inseminação, quando o E1T1-15B apresentou o maior valor ($3,35\pm 0,15$ vs $2,80\pm 0,13$). Houve efeito do tratamento sobre o vigor, apenas no tempo 0h, que corresponde ao momento de avaliação, imediatamente após a preparação das doses, referentes a cada tratamento (tabela 16). Neste momento, o E1T1-15B apresentou também o maior valor, quanto ao vigor espermático. Além disso, o vigor apresentou uma queda após 24 horas de armazenamento, em relação ao tempo 0h. Desta forma, pode ser observado que na segunda inseminação, as fêmeas pertencentes ao E1T1-15B, foram inseminadas mais cedo em relação à coleta.

As durações das inseminações não diferiram ($p>0,05$) entre os tratamentos para nenhuma das inseminações, que, no entanto, foram muito longas quando comparadas aos tempos descritos por Alkmin (2010), quando variaram de 4 a 6 minutos. A utilização de pipetas diferentes

nos dois trabalhos pode ser uma das razões à explicar estas diferenças.

Na tabela 19 estão apresentados os dados relativos às características do cio, fertilidade e prolificidade das fêmeas suínas inseminadas no experimento I. Neste experimento, foram inseminadas 20 porcas, 10 para cada tratamento, sendo todas de primeira ordem de parto.

O intervalo desmama-cio (IDC) foi de 94,05 horas (3,91 dias) para as fêmeas pertencentes ao E1T1-15B e de 101,26 horas (4,21 dias) para as fêmeas do E1T2-3B, não havendo, diferenças ($p > 0,05$) entre os tratamentos para esta característica. O IDC observado neste experimento está de acordo com Killen *et al.* (1992), que afirmaram ser normal o IDC entre 4 a 6 dias, considerando-o como anormal quando superior a 10 dias. Além disso, este é o IDC padrão observado na maioria das granjas tecnificadas atualmente (Vesseur, 1997; Kummer *et al.*, 2003). Para Steverink *et al.* (1999), o IDC que possibilita a máxima produtividade nas matrizes suínas varia de 3-7 dias

Ao trabalhar com porcas da mesma genética (DB25[®]) pluríparas, Alkmin (2010) observou um IDC de $81,14 \pm 3,77$ horas (3,38 dias) para as fêmeas utilizadas em um tratamento e de $86,76 \pm 3,77$ horas (3,62 dias) para as fêmeas referentes ao segundo tratamento. Em 2007, Braga realizou um trabalho na mesma empresa, com porcas pluríparas e observou um IDC médio de $90,38 \pm 17,55$ horas, sendo ambos os valores menores que os observados no presente experimento. No entanto, Siqueira (2011)

utilizou animais de mesma genética e na mesma granja, em um estudo envolvendo fêmeas de primeira à quarta ordens de parto, quando descreveu um IDC médio total de $105,55 \pm 3,74$ horas ($4,66 \pm 1,16$ dias), valor superior aos descritos por Alkmin (2010) e por Braga (2007), porém, bem similares aos valores observados no presente experimento.

Vários fatores além da genética podem afetar o IDC, destacando-se a duração da lactação, ordem de parto, nutrição, frequência de exposição ao macho, tamanho da leitegada, estação do ano e manejo (Dial *et al.*, 1992; Einarsson *et al.*, 1998). A redução da duração da lactação leva ao prolongamento do IDC (Xue *et al.*, 1993). A duração da lactação para as fêmeas utilizadas no presente experimento foi de 21 dias, em média. De acordo com Mabry *et al.* (1996), o IDC é mínimo quando de lactações entre 22 a 27 dias. Os autores afirmaram ainda que a duração da lactação tem efeito quadrático sobre o IDC, de modo que este intervalo foi maior ($p < 0,05$) para lactações menores que 22 dias ou maiores que 27 dias.

Além disso, o IDC, de um modo geral, é mais longo para primíparas do que para pluríparas (Wilson e Dewey, 1993). Esta diferença se deve, principalmente, à maior sensibilidade das primíparas diante da grande demanda energética durante a lactação. De acordo com Fahmy (1981), o IDC diminui drasticamente após o segundo parto, permanecendo inalterado a partir do terceiro parto.

Tabela 18: Parâmetros de controle de fêmeas inseminadas com sêmen diluído e resfriado, oriundo de doses heterospermicas hiperconcentradas (15×10^9 espermatozoides/dose de 100 mL) e rediluídas após 12 horas de armazenamento a 5°C, para doses padrão, antes das inseminações artificiais ou de doses heterospermicas padrão (3×10^9 espermatozoides/dose de 100 mL)

Parâmetros de controle	Primeira IA		Segunda IA		Terceira IA		Quarta IA	
	E1T1-15B	E1T2-3B	E1T1-15B	E1T2-3B	E1T1-15B	E1T2-3B	E1T1-15B	E1T2-3B
Tempo da coleta à IA (horas)	24,52 ± 2,95	20,22 ± 3,41	20,43 ± 2,25 ^b	26,16 ± 1,03 ^a	20,28 ± 2,58	24,28 ± 2,19	26,46 ± 3,34	27,83 ± 3,13
Início do cio à IA (horas)	12,98 ± 1,19	11,06 ± 0,79	25,48 ± 0,33	25,65 ± 0,33	35,99 ± 1,01	34,97 ± 0,60	49,66 ± 0,43	49,06 ± 0,26
Motilidade do sêmen (%)	75,00 ± 1,05	75,50 ± 0,90	75,00 ± 1,05	74,50 ± 1,17	71,00 ± 0,67 ^b	73,50 ± 0,76 ^a	70,00 ± 0,00	70,83 ± 0,08
Vigor espermático (0-5)	3,40 ± 0,12	3,05 ± 0,14	3,35 ± 0,15 ^a	2,80 ± 0,13 ^b	2,95 ± 0,14	3,20 ± 0,11	3,17 ± 0,17	3,17 ± 0,17
Duração da IA (minuto)	18,60 ± 2,44	21,50 ± 2,78	18,40 ± 2,58	24,80 ± 4,72	19,70 ± 3,08	22,70 ± 3,19	13,00 ± 2,31	21,00 ± 4,47
Tempo da coleta à rediluição (horas)	10,45 ± 0,22	—	10,84 ± 0,09	—	12,53 ± 0,87	—	13,77 ± 1,01	—
Tempo da rediluição à IA (horas)	14,07 ± 3,05	—	9,59 ± 2,30	—	7,91 ± 2,04	—	12,87 ± 3,02	—
Intervalo entre IAs (horas)	—	—	12,30 ± 1,01	14,65 ± 0,81	11,61 ± 0,78 ^a	9,12 ± 0,68 ^b	12,84 ± 0,87	14,67 ± 0,23
Intervalo última IA ao final do cio (horas)	—	—	—	—	7,33 ± 0,00	12,22 ± 1,63	17,06 ± 2,19	12,24 ± 3,46

^{a,b} Médias seguidas por letras diferentes na linha, dentro de cada inseminação artificial, diferem entre si ($p < 0,05$)

Tabela 19: Comportamento do cio, fertilidade e prolificidade de fêmeas suínas inseminadas com sêmen diluído e resfriado, oriundo de doses heterospérmicas hiperconcentradas (15×10^9 espermatozoides/dose de 100 mL) e rediluídas após 12 horas de armazenamento à 5°C, para doses padrão para as inseminações artificiais ou de doses heterospérmicas padrão (3×10^9 espermatozoides/dose de 100 mL)

Parâmetros Avaliados	Tratamentos	
	E1T1-15B	E1T2-3B
Número de porcas	10	10
Ordem de parto	1	1
Intervalo desmama cio (horas)	94,05 ± 3,45	101,26 ± 2,41
Duração do cio (horas)	64,70 ± 2,79 ^a	55,95 ± 2,93 ^b
Número de IA's	3,90 ± 0,10	3,60 ± 0,16
Taxa de gestação (%)	90% (9/10)	90% (9/10)
Taxa de parto (%)	90% (9/10)	80% (8/10)*
Intervalo última IA retorno ao cio (dias)	16	24
Número de leitões nascidos vivos	12,44 ± 1,24	12,63 ± 1,54*
Número de leitões natimortos	1,11 ± 0,39	0,75 ± 0,41
Número de leitões mumificados	1,56 ± 1,31	0,22 ± 0,15
Número total de leitões nascidos	15,11 ± 1,33	13,44 ± 1,55

^{a,b}Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem entre si ($p < 0,05$)

*Os dados apresentados para o número de leitões nascidos vivos referem-se à oito das nove fêmeas que ficaram gestantes, por ter uma das fêmeas abortado. No entanto, os leitões foram devidamente contados e estão apresentados nos itens envolvendo o número de nascidos totais e de mumificados.

A duração do cio diferiu ($p < 0,05$) entre as fêmeas do E1T1-15B e E1T2-3B, sendo maior para as fêmeas do E1T1-15B ($64,70 \pm 2,79$ horas vs $55,95 \pm 2,93$ horas), possivelmente, acompanhando o menor IDC observado nas fêmeas deste tratamento, embora esta variável não tenha diferido ($p > 0,05$) entre os tratamentos. Os valores observados, quanto à duração do cio, estão dentro do intervalo normal apresentado pela literatura, uma vez que em porcas pode variar de 24 até 96 horas, sendo influenciada por vários fatores, tais como a ordem de parto e o IDC (Weitze *et al.*, 1994; Soede *et al.*, 1995a).

Como observado neste experimento, a duração do cio manteve uma relação inversamente proporcional com o IDC. Assim, geralmente é menor quando o IDC é maior, o que explica a sua maior duração nas porcas do E1T1-15B, que apresentaram

o menor IDC. Rojkittikhun *et al.* (1992) e Weitze *et al.* (1994) também observaram uma influência do IDC prolongado sobre a duração do estro. De acordo com Steverink *et al.* (1999), a duração do estro diminuiu ($p < 0,05$) quando o IDC aumentou de 4 para 5 dias ($56,0 \pm 1,2$ vs $50,3 \pm 1,1$ horas) e de 5 para 6 dias ($50,3 \pm 1,1$ vs $45,8 \pm 1,2$ horas).

Steverink *et al.* (1997) observaram que a duração do cio foi menor para porcas de primeira e segunda ordens de parto, e também para leitoas em relação às porcas pluríparas. Siqueira (2011) descreveu uma duração média total de $54,50 \pm 1,23$ horas, para o cio de porcas, valor muito próximo dos observados no presente estudo para as fêmeas do E1T2-3B. No entanto, Alkmin (2010), observou uma duração média do estro, para porcas pluríparas de mesma genética, de $61,7 \pm 2,04$ horas; valor similar ao observado por Braga (2007), em um

trabalho realizado na mesma granja (63,61±8,81 horas). Os valores observados nestes dois trabalhos superaram, em muito, a duração do cio das fêmeas do E1T2-3B, do presente estudo, sendo, no entanto, similares ao valor observado para as fêmeas do E1T1-15B (64,70±2,79 horas).

Steeverink *et al.* (1999) observaram que 23,3% da variação na duração do cio está relacionado ao componente granja, podendo esta variação estar associada às diferenças de interpretação dos sinais de cio, experiência do avaliador e também a fatores específicos, tais como estresse dos animais (Soede e Kemp, 1997), qualidade do macho utilizado para estimular as fêmeas (Jongman *et al.*, 1996), raça e condição nutricional das leitoas e porcas.

O número médio de inseminações não diferiu ($p>0,05$) entre os tratamentos, sendo de 3,90±0,10 para o E1T1-15B e de 3,60±0,16 para o E1T2-3B. O número médio de inseminações no trabalho de Braga (2007) foi de 3,41±0,54, sendo no trabalho de Alkmin (2010) de 3,25±0,11. Os protocolos de inseminação diferiram entre os experimentos, de modo que no trabalho de Alkmin (2010) e de Braga (2007) a quarta inseminação só era realizada se as fêmeas permanecessem em cio por, no mínimo, 24 horas após a terceira inseminação. No presente experimento, as quartas inseminações foram realizadas em todas as fêmeas em cio 12 horas após a terceira inseminação.

Sabe-se que, em porcas, ótimos resultados de fertilidade podem ser alcançados quando as inseminações são realizadas de 24 a 12 horas antes da ovulação (Soede *et al.*, 1995b; Steeverink *et al.*, 1997). Entretanto, a grande variação existente na duração do cio, associada à reduzida capacidade de se prever o momento da ovulação tornam muito difícil inseminar as fêmeas suínas apenas nos intervalos ideais pré-ovulação. Desta forma, a maioria das porcas requer várias inseminações durante o cio (Soede *et*

al., 2000). Normalmente, os protocolos de inseminação em granjas utilizam de duas a três inseminações por cio (Johnson *et al.*, 2000; Bortolozzo e Wentz, 1997). No entanto, Soede *et al.* (2000) afirmaram não ter havido melhoria no desempenho reprodutivo de rebanhos utilizando inseminações à intervalos de 12 horas, quando comparados ao de rebanhos que usavam inseminações a cada 24 horas.

Tal observação indica que o número de inseminações por cio pode ser reduzido, sem que haja redução da eficiência reprodutiva do plantel. Este é um fator muito importante quando se busca a otimização do uso de machos dentro de um rebanho comercial.

Entretanto, é importante ressaltar que o intervalo utilizado entre inseminações sofre a influência de alguns fatores, como, por exemplo, da temperatura de resfriamento e do período de estocagem do sêmen, sendo indicada a redução do intervalo entre as inseminações, quando o sêmen for resfriado e usado após armazenamento (Soede *et al.*, 2000). Além disso, a duração do estro exerce efeito direto sobre a eficiência de um protocolo de inseminação, uma vez que na presença de cios mais longos, haverá maior chance de se realizar, pelo menos uma inseminação, dentro do intervalo ótimo pré-ovulação.

Atualmente, são raros os experimentos que utilizam a avaliação da fertilidade do sêmen *in vivo*, ou seja, utilizando a inseminação de fêmeas, com avaliação subsequente das taxas de gestação, taxas de parição e tamanho das leitegadas. Esta nova tendência se deve principalmente ao alto custo dos experimentos realizados a campo, o que torna difícil a sua execução, principalmente, quando não há parceria com empresas privadas interessadas no desenvolvimento de novas tecnologias. Soma-se a isso, o desenvolvimento de técnicas moleculares capazes de avaliar com maior profundidade e rapidez, as

características morfológicas e funcionais dos espermatozoides. Outro complicador é o fator tempo, uma vez que experimentos a campo são mais demorados, requerendo maior tempo para sua execução.

No entanto, deve-se sempre enfatizar que até o presente momento, não existem testes laboratoriais que isoladamente ou em conjunto, sejam capazes de garantir a manutenção da capacidade fecundante de uma amostra de sêmen, submetida a um determinado tratamento, principalmente, quando se leva em consideração as modestas correlações encontradas entre os resultados observados *in vitro* e a fertilidade à campo (Rodriguez-Martinez, 2003). Foote (2003) afirmou que a completa compreensão dos fenômenos relacionados à fertilização continua longe de ser alcançada.

No presente experimento, avaliou-se a capacidade fecundante dos espermatozoides submetidos aos tratamentos aqui propostos utilizando a inseminação de 20 fêmeas, estando os dados referentes à fertilidade e à prolificidade das mesmas, apresentados na tabela 19.

As taxas de gestação, de parto e as características das leitegadas não foram influenciadas ($p > 0,05$) pelos tratamentos (tabela 19). Das 10 fêmeas inseminadas no E1T1-15B (doses heterospérmicas hiperconcentradas contendo 15×10^9 de espermatozoides em 100 mL, e re-diluídas após 12 horas de armazenamento à 5°C para doses padrão de 3×10^9), apenas uma retornou ao cio aos 16 dias após a última inseminação. Do mesmo modo, apenas uma das 10 fêmeas inseminadas no E1T2-3B (doses heterospérmicas padrão contendo 3×10^9 em 100 mL e resfriado à 5°C), retornou ao cio aos 24 dias após a última inseminação. Assim, para ambos os tratamentos, a taxa de gestação foi de 90%.

Uma das fêmeas pertencentes ao E1T2-3B abortou aos 82 dias de gestação, de modo que apenas 8 das 10 fêmeas inseminadas chegaram ao parto. Assim, a taxa de parição

foi de 80% para o E1T2-3B e de 90% para o E1T1-15B. Como o número de leitões abortados (13 leitões, sendo 1 mumificado) foi cuidadosamente contado durante o aborto, estes valores foram incluídos nas médias referentes ao número de leitões nascidos totais e mumificados, e submetidos às análises estatísticas.

Em 1944, Lasley e Bogart descreveram a pronunciada sensibilidade dos espermatozoides do varrão ao resfriamento, o que impediu o desenvolvimento de técnicas de preservação que permitissem reduzir a temperatura de armazenamento, para temperaturas inferiores à 15°C. Esta maior sensibilidade está relacionada à uma maior proporção de ácidos graxos insaturados:saturados nos fosfolípides da membrana plasmática, bem como às baixas concentrações de colesterol, aliada à sua distribuição assimétrica na membrana plasmática (De Leeuw *et al.*, 1990; White, 1993). De acordo com Althouse *et al.* (1998), a temperatura crítica para o choque térmico no sêmen suíno é 12°C; assim, na rotina das granjas o sêmen é mantido, normalmente à 15°C - 20°C até a sua utilização para a inseminação artificial das fêmeas suínas.

No entanto, o desenvolvimento de diluidores capazes de conferir adequada proteção à membrana espermática, impulsionou o desenvolvimento de protocolos de resfriamento do sêmen até 5°C, apesar de ainda serem poucos os trabalhos que avaliaram a sua eficiência *in vivo*.

Conjuntamente, Roy (1955), Polge (1956a), Du Mesnil du Buisson (1956), Du Mesnil du Buisson e Dauzier (1956) e Dziuk (1958) afirmaram que os diluidores que melhor preservam a motilidade do sêmen parecem ser aqueles apresentando glicose ou glicina, associados à gema de ovo ou leite em sua formulação.

Ao trabalharem com sêmen resfriado à 5°C, diluído em diluidor de leite desnatado-

glicose, Kasuya e Kawabe (1977) obtiveram uma média de leitões nascidos vivos de 10,2 leitões. No mesmo sentido, Foote (2002) utilizou sêmen diluído em diluidor a base de gema de ovo, resfriado a 5°C e preservado por 48 horas para inseminar 70 leitoas e 55 porcas, obtendo uma taxa de parição de 63%, com uma média de leitões nascidos vivos de 10,8.

Dentro de uma mesma linha de pesquisa, utilizando o sêmen suíno preservado a 5°C, diferentes trabalhos foram realizados (Braga, 2007; Alkmin, 2010; Siqueira, 2011), todos utilizando o diluidor glicina-gema de ovo, proposto por Foote (2002).

Braga (2007) obteve uma taxa de gestação de 77,14%, acompanhada por um número médio de leitões nascidos totais de 10,72 e de nascidos vivos de 10,12 leitões, ao utilizar o diluidor proposto por Foote (2002), sendo o sêmen resfriado à 5°C. Nesta mesma linha de pesquisa, a taxa de gestação observada por Alkmin (2010), foi de 90%, associada a um número de nascidos totais de $13,39 \pm 0,85$ e de nascidos vivos de $11,82 \pm 0,73$, sendo estes resultados superiores aos descritos por Braga (2007) e por Foote (2002). Os dados referentes à prolificidade das fêmeas inseminadas por Alkmin (2010) foram inferiores aos observados no presente experimento, para ambos os tratamentos, tanto para o número de nascidos totais quanto para o número de nascidos vivos.

Em um trabalho conduzido por Siqueira (2011), doses oriundas do ejaculado total foram diluídas em diluidor GGO e resfriadas à 5°C em diferentes concentrações, a saber, 3×10^9 (grupo controle), 6, 9 ou 12×10^9 de espermatozoides/dose, pré-rediluição. As doses hiperconcentradas permaneceram armazenadas por 16 horas na média, até a rediluição para doses inseminantes padrão de 3×10^9 de espermatozoides/dose. Neste experimento, a autora obteve taxas de gestação e de parto de 100% para os

tratamentos envolvendo as concentrações de 3 e 6 bilhões, resultados superiores aos observados no presente estudo, para ambos os tratamentos, que foi de 90% para a taxa de gestação e de 80% para a taxa de parto no T2. No entanto, para as doses contendo 9×10^9 e 12×10^9 , as taxas de gestação e de parto foram de 76,92% e 75%, respectivamente. Observa-se, desta forma, que as doses apresentando concentrações mais próximas ao E1T1-15B, do presente trabalho (15×10^9 de espermatozoides/dose pré-rediluição), responderam por uma menor fertilidade.

No que diz respeito aos dados referentes à prolificidade das fêmeas inseminadas, nenhum dos tratamentos utilizados por Siqueira (2011) apresentou média superior à descrita no presente trabalho, para o número total de leitões nascidos e do total de vivos. Assim, as fêmeas inseminadas com doses oriundas da rediluição de doses contendo 12×10^9 espermatozoides, após 16 horas de armazenamento, obtiveram média de leitões nascidos totais de $12,80 \pm 1,25$ e de nascidos vivos de $12,10 \pm 1,17$. No entanto, deve-se ressaltar que o período médio de armazenamento do sêmen, no experimento conduzido por Siqueira (2011), foi superior ao do presente experimento (16 horas vs 11 horas, respectivamente).

De acordo com os dados apresentados anteriormente, envolvendo a sensibilidade do sêmen do varrão ao resfriamento, as taxas de gestação (90%) e de parição (90% para E1T1-15B e de 80% para o E1T2-3B), observadas no presente experimento, associadas à média de leitões nascidos totais de $15,11 \pm 1,33$ para o T1 e de $13,44 \pm 1,55$ para o T2, merecem ser enfatizados. Notadamente, quando se busca o desenvolvimento de um protocolo para o resfriamento e transporte do sêmen de varrões e, principalmente, quando se considera o desafio a que foram expostos os espermatozoides, após a hiperconcentração, resfriamento à 5°C, rediluição e um novo

armazenamento por diferentes períodos, antes da realização das inseminações artificiais.

Os dados relacionados ao número de leitões natimortos e mumificados encontrados no presente experimento (tabela 19), estão dentro dos considerados como normais pela literatura, ao considerar-se que as perdas fetais podem variar de 5 a 15% (Van der Lende, 2000), sendo a percentagem de natimortos para o E1T1-15B de 7,34% ($1,11 \pm 0,39$) e para o E1T2-3B, de 5,58% ($0,75 \pm 0,41$). De acordo com Muirhead e Alexander (1997) o percentual de leitões natimortos aceitável varia de 3 a 5%, não devendo ultrapassar 7% (Dial *et al.*, 1992). No entanto, Cutler *et al.* (1992) descreveram percentuais de natimortalidade variando de 3 a 10%.

O número de natimortos observados no presente experimento foi superior ao descrito por Braga (2007) de $0,97 \pm 1,02$ e por Alkmin (2010) de $0,90 \pm 0,29$. Por sua vez, os números médios observados por Siqueira (2011), referentes aos partos de 46 porcas, foram ainda menores, sendo de $0,38 \pm 0,70$ natimortos e $0,26 \pm 0,59$ mumificados.

Vários são os fatores associados à presença de natimortos, tais 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 térmico, intervenção manual durante o parto, condição corporal da fêmea ao parto, deficiência nutricional (Leenhouders *et al.*, 1999; Tantasuparuk *et al.*, 2000; Lucia Jr *et al.*, 2002; Schneider, 2002). Cavalcante (1987) relatou que aproximadamente 5 a 8% dos leitões nascem mortos e que as taxas de mortalidade podem variar de 3,4 a 19,9%.

Em um estudo baseado em necropsias, Wentz *et al.* (2006) observaram que aproximadamente 10% dos natimortos morrem no período pré-parto, 75% no

período intra-parto e 15% logo após o nascimento. Assim, a ocorrência de leitões natimortos em geral está associada à anoxia fetal, pelo rompimento do cordão umbilical, o que é bastante comum em partos distócicos.

No que se refere ao número de leitões mumificados, o número encontrado para o E1T1-15B foi $1,56 \pm 1,31$ (10,32%), sendo de $0,22 \pm 0,15$ (1,64%), para o E1T2-3B. Uma das fêmeas do E1T1-15B pariu 12 leitões mumificados, o que elevou, em muito, a média do tratamento. Provavelmente, isto se deva a uma falha na vacinação, sendo, portanto um fato isolado, que pode ocorrer em experimentos realizados em rebanhos comerciais.

Schneider *et al.* (2003) afirmaram que sob condições endêmicas, especialmente as fêmeas primíparas podem apresentar taxas de mumificados maiores que as fêmeas de ordem de parto mais avançadas, devendo-se esse fato à condição imunológica inferior das fêmeas mais jovens, as quais ainda não foram expostas por tempo suficiente aos patógenos endêmicos presentes no plantel. Além disso, como o desenvolvimento uterino está relacionado à alternância do estrógeno e da progesterona a cada ciclo reprodutivo, porcas mais velhas apresentam um maior número de ciclos, o que implica em maior desenvolvimento e melhor capacidade uterina quando comparadas às fêmeas mais jovens.

Privado Filho e Toniolo (2011) observaram que a média anual de mumificados para porcas de primeira ordem de parto foi de 2,9%, sendo para as porcas de segunda ordem de parto de 2,5%. Assim, demonstrou-se que fêmeas de primeira ordem de parto apresentaram uma taxa anual de mumificados superior à das fêmeas de segunda ordem de parição.

O número de leitões mumificados observado por Braga (2007) foi de $0,04 \pm 0,19$ e por Alkmin (2010) de $0,30 \pm 0,30$. Estes valores são muito

inferiores aos observados no presente experimento. Vale salientar, entretanto, que os dois experimentos citados trabalharam com porcas mais velhas, acima da terceira ordem de parto.

Tem sido descrito que a presença de fetos mumificados está associada à doenças infecciosas, ordem de parto, tamanho da leitegada, capacidade uterina, temperatura ambiente e micotoxinas (Dial *et al.*, 1992; Schneider *et al.*, 2003). A mumificação é caracterizada pela morte fetal após a ossificação, com reabsorção dos líquidos dos tecidos moles (Sims e Glastonbury, 1996). A calcificação do esqueleto fetal ocorre a partir dos 35 dias de gestação, de modo que nos leitões que morrem a partir desta idade gestacional, não há reabsorção do tecido ósseo já calcificado. Assim, quando não ocorre contaminação bacteriana, há uma desidratação progressiva dos tecidos moles (Sims e Glastonbury, 1996). Desta forma, os fetos mumificados apresentam elevado grau de desidratação e escurecem, sendo que a coloração varia de cinza escura, marrom escuro ou quase preta. Estes fetos são expulsos junto com os outros leitões durante o parto, sendo que a placenta correspondente apresenta-se também desidratada (Dial *et al.*, 1992).

Considera-se normal uma prevalência de 0,5% de mumificação fetal, sendo o percentual máximo aceitável de 1,5%, sendo ambos muito inferiores aos observados no presente experimento. No entanto, Borges *et al.* (2003) registraram uma variação de 3,6 a 5,6 % de mumificados para quatro granjas brasileiras. De acordo com Borges *et al.* (2008), a crescente preocupação com o percentual de fetos mumificados se deve à sua possível associação com o aumento do tamanho das leitegadas, observado nos últimos anos, nas porcas hiper-prolíficas. Vale salientar, também, a maior precisão dos dados coletados nas granjas envolvendo fetos mumificados.

Concluindo, Alkmin (2010) estudou o comportamento dos primeiros 15 mL da fração rica (P1) quando diluídos em diluidor GGO (Foote, 2002) e resfriados à 5°C, em contêiner especial, para transporte do sêmen de suínos. Siqueira (2011) trabalhou com a hiperconcentração de doses espermáticas oriundas do ejaculado total (3-grupo controle, 6, 9 ou 12 bilhões de espermatozoides/dose de 100 mL pré-rediluição) com posterior rediluição para doses inseminantes padrão de 3×10^9 após 12 ou 24 horas de armazenamento à 5° ou 17°C, sendo as doses diluídas em GGO ou MR-A®. Segundo a autora, não houve efeito do tratamento ($p > 0,05$) quanto aos dados de fertilidade e características das leitegadas. Desta forma, o protocolo envolvendo a diluição em GGO e o resfriamento à 5°C foi capaz de manter tanto as características físicas e morfológicas do sêmen, quanto a fertilidade e prolificidade das fêmeas suínas inseminadas. Os bons resultados obtidos por Alkmin (2010) e por Siqueira (2011), demonstrados acima, possibilitaram o desenvolvimento do protocolo avaliado no presente trabalho.

Assim, de acordo com a proposta envolvendo a hiperconcentração do sêmen do touro, visando otimizar a estocagem e/ou transporte destas doses, o sêmen oriundo dos primeiros 15 mL do ejaculado de varrões foi hiperconcentrado (15 bilhões de espermatozoides em 100 mL), diluído em diluidor GGO e resfriado a 5°C. Desta forma, o número de doses transportadas pelo contêiner proposto por Roner *et al.* (2006) passou de 12 para 60 no experimento 1, sendo as doses mantidas hiperconcentradas por 12 horas, quando então foram rediluídas para as doses inseminantes de 3 bilhões e usadas para as inseminações imediatamente ou mantidas à 5°C por até 36 horas, sem que houvesse perda da fertilidade.

4.2. EXPERIMENTO II: Efeito da hiperconcentração de doses seminais heterospermicas (24 bilhões de espermatozoides por dose de 100 mL) rediluídas após 12 horas de armazenamento à 5°C sobre as características físicas do sêmen avaliado a fresco, pós diluído, pós rediluição para doses padrão (3 bilhões/100 mL) e armazenadas por 12, 24 e 36 horas após a coleta e sobre a fertilidade de fêmeas suínas inseminadas

4.2.1. Características físicas do sêmen e desempenho reprodutivo dos varrões

No experimento II foram utilizados 22 ejaculados oriundos de nove varrões, sendo três da raça Large White e seis da raça Landrace. Na tabela 20, estão apresentados os dados referentes à distribuição da frequência de utilização dos machos no experimento II por tratamento. Houve uma distribuição bastante uniforme das duplas de machos entre os tratamentos ao longo do período experimental, como podemos observar na tabela 20.

Tabela 20: Distribuição da frequência de utilização das duplas de varrões entre os tratamentos para o experimento II

Tratamentos	Duplas de Varrões									Total
	5	10	11	12	13	14	15	16	17	
E2T1-24B	2	6	4	4	11	5	0	6	0	38
E2T2-3B	2	4	5	5	9	2	2	3	3	35
Total	4	10	9	9	20	7	2	9	3	73

Observa-se no modelo experimental apresentado na tabela 21, a ausência ($p>0,05$) de efeito do tratamento bem como da interação tratamento x período de armazenamento sobre a motilidade, nos

diferentes tempos de armazenamento. Entretanto, o período de armazenamento do sêmen influenciou ($p<0,05$) a motilidade espermática (tabelas 21 e 22).

Tabela 21: Valores de p para os tratamentos, período de armazenamento e interação tratamento x período de armazenamento para a motilidade do sêmen

Fontes de variação	Nível de significância (valor de p)
Tratamento	0,6993
Período de armazenanto	0,0001
TratamentoxPeríodo de armazenamento	0,778

Na tabela 22 estão apresentados os dados referentes ao comportamento da motilidade do sêmen no experimento II para os dois tratamentos, sendo o E2T1-24B referente às doses contendo 24 bilhões de espermatozoides móveis, rediluídas após 12 horas de armazenamento a 5°C para doses padrão de 3 bilhões em diluidor GGO, e o

E2T2-3B o grupo controle, referente a doses inseminantes padrão contendo 3 bilhões de espermatozoides móveis diluídos em diluidor GGO e resfriados a 5°C.

Como pode ser observado nas tabelas 21 e 22, houve efeito ($p < 0,05$) apenas do período de armazenamento do sêmen sobre a motilidade espermática.

Tabela 22: Comportamento da motilidade espermática do sêmen diluído, resfriado a 5°C e armazenado em contêiner especial, oriundo de doses heterospérmicas hiperconcentradas (24×10^9 espermatozoides/dose-T1), antes e após a rediluição para doses padrão ou de doses heterospérmicas padrão (3×10^9 espermatozoides/dose-T2), avaliadas em diferentes períodos de tempo após a coleta do sêmen

Tratamento	Períodos de avaliação					
	Fresco	Zero horas	12 horas	Rediluição	24 horas	36 horas
E2T1-24B (%)	86,50±1,24	85,00±1,24	78,89±1,31	73,89±1,31	71,11±1,31	68,33±1,60
E2T2-3B (%)	86,36±1,18	84,54±1,18	77,73±1,18	—	72,22±1,31	71,00±1,76
Total	86,42±0,85 ^a	84,76±0,85 ^a	78,24±0,87 ^b	73,89±1,31 ^c	71,67±0,92 ^{cd}	69,55±1,17 ^d

^{a,b}Médias acompanhadas por letras diferentes na linha diferem entre si ($p < 0,05$)

No experimento I, os valores de motilidade do sêmen a fresco para os dois tratamentos foram sempre os mesmos, por serem as doses oriundas da mesma coleta. Entretanto, no experimento II os dados referentes à motilidade do E2T2-3B (86,36±1,18%), embora similares ($p > 0,05$) aos do E2T1-24B (86,50±1,24%), não são iguais. Isto se deve ao fato de que em uma das coletas, o E2T1-24B não foi processado, sendo utilizado apenas o processamento para o E2T2-3B, que passou a ter uma coleta a mais que o E2T1-24B. Desta forma, também serão observadas diferenças para os valores de vigor do sêmen a fresco (tabela 23), motilidade espermática média para os dois tratamentos, número de espermatozoides/mL, número de espermatozoides móveis/mL, total de espermatozoides na P1 entre os tratamentos (tabela 24).

Embora não tenha havido diferenças ($p > 0,05$) dos valores de motilidade entre o sêmen a fresco e o avaliado as zero horas, observou-se uma queda da motilidade

(78,24±0,87%, $p < 0,05$), quando da avaliação às 12 horas de estocagem do sêmen (tabela 22), condição também observada no experimento I. Além disso, observou-se que a motilidade do sêmen a fresco no experimento II foi numericamente superior à observada no experimento I (86,42±0,85% vs 82,27±1,04%). Há que se enfatizar, neste sentido, que embora os varrões utilizados nos dois experimentos tenham sido os mesmos, as duplas foram diferentes, ou seja, os mesmos machos foram submetidos a diferentes combinações entre si, de forma à distribuir uniformemente a participação de cada varrão nos tratamentos (tabela 20).

Os valores de motilidade do sêmen a fresco heterospérmico, diluído em diluidor GGO (Foote, 2002), imediatamente após a coleta, foram muito similares aos valores descritos por Saravia (2008) para o sêmen oriundo da P1 (primeiros 10 mL da fração rica) após a coleta e diluição em BTS (86,42% vs 86,2%). A motilidade descrita por Alkmin (2010) para o sêmen a fresco, oriundo dos

primeiros 15 mL da fração rica, foi inferior aos dois valores descritos acima ($74,5 \pm 1,17\%$).

Quando da rediluição do sêmen (E2T1-24B), observou-se nova queda da motilidade ($p < 0,05$), que caiu de $78,89 \pm 1,31\%$ para $73,89 \pm 1,31\%$. Assim, a partir de 12 horas após a coleta, observou-se uma redução progressiva da motilidade, sendo o menor valor ($p < 0,05$) observado às 36 horas de armazenamento ($69,55 \pm 1,17\%$). Ao contrário, no experimento I, embora tenha havido uma redução da motilidade às 12 horas de armazenamento, esta se manteve, sem posteriores reduções até as 36 horas. A queda progressiva da motilidade no transcorrer do armazenamento do sêmen, também foi observada por Alkmin (2010) para o sêmen armazenado à 5°C , em diluidor GGO, até as 72 horas após a coleta. Naquele experimento, a média da motilidade, quando avaliada às 36 horas de estocagem foi inferior a 60% ($55,00 \pm 2,61\%$), sendo este valor inferior ao observado, para o mesmo período de armazenamento, no presente experimento ($69,55 \pm 1,17\%$).

Em um estudo conduzido por Siqueira (2011), utilizou-se doses oriundas do ejaculado total e hiperconcentradas, de modo a conter 6, 9 ou 12 bilhões de espermatozoides, diluídas em diluidor GGO e resfriadas a 5°C . Após 17,6 horas de armazenamento, estas doses foram rediluídas para doses padrão contendo 3 bilhões de espermatozoides em 100 mL. O grupo controle era composto por doses contendo 3 bilhões de espermatozoides e submetidas ao mesmo protocolo de resfriamento. A motilidade do sêmen para os três tratamentos (controle, 6 e 9 bilhões) foi avaliada até 48 horas após as coletas. De acordo com a autora, houve queda significativa da motilidade após 12 horas de armazenamento para os três tratamentos, embora não tenha havido efeito da hiperconcentração ($p > 0,05$) sobre a mesma.

Assim, para as doses contendo 6 bilhões, a motilidade foi de $75,23 \pm 1,14\%$, sendo para as doses contendo 9 bilhões de $75,58 \pm 1,47\%$, quando estocadas por 12 horas. Estes valores de motilidade foram inferiores aos dos dois tratamentos, do presente experimento, quando avaliados no mesmo período de armazenamento (12 horas). No entanto, estes valores são superiores aos valores médios do sêmen hiperconcentrado (E2T1-24B), após a rediluição ($73,89 \pm 1,31\%$, tabela 22).

Neste caso, dois fatores devem ser considerados. Inicialmente, deve-se salientar que o período de tempo transcorrido até a rediluição das doses hiperconcentradas foi superior (17,6 vs 13,31 horas) no experimento de Siqueira (2011). Em segundo lugar, deve-se considerar o número de espermatozoides presente nas doses hiperconcentradas do E2T1-24B, de 24 bilhões, que impõem um maior desafio às células espermáticas, capaz de explicar a menor motilidade apresentada após a rediluição, mesmo na presença de um menor tempo de estocagem, como citado.

Siqueira (2011) observou que nas doses hiperconcentradas, contendo 12 bilhões de espermatozoides, nas quais a motilidade foi avaliada até 24 horas após a coleta, houve uma redução ($p < 0,05$) da motilidade, imediatamente após a diluição para a concentração desejada, em relação à do sêmen a fresco, condição não observada no presente experimento. Além disso, as doses hiperconcentradas apresentaram uma queda de motilidade às 12 horas de armazenamento pré-rediluição, em relação ao sêmen pós diluído ($72,50 \pm 0,55\%$ vs $76,26 \pm 0,53\%$, $p < 0,05$), embora a motilidade tenha sido mantida, após a rediluição, até as 24 horas de armazenamento. Diferentemente, no presente experimento, as doses hiperconcentradas apresentaram uma redução ($p < 0,05$) da motilidade após a rediluição ($78,24 \pm 0,87\%$ vs $73,89 \pm 1,31\%$),

havendo uma queda progressiva dos seus valores até as 36 horas de armazenamento (tabela 22).

No E1T1-15B, observou-se que a motilidade espermática às 36 horas de armazenamento, superou a motilidade observada para o E2T1-24B, ou seja, nas doses hiperconcentradas contendo 24 bilhões de espermatozoides, com valores de $70,71 \pm 1,88\%$ e $68,33 \pm 1,60\%$, respectivamente. Além disso, observou-se que a queda em relação ao período de 24 horas de armazenamento, foi superior no experimento II. Assim, as doses referentes ao E2T1-24B apresentaram uma motilidade média de $71,11 \pm 1,31\%$ às 24 horas, que caiu para $68,33 \pm 1,60\%$ às 36 horas (tabela 22). Por outro lado, no experimento I a motilidade para o E1T1-15B às 24 horas foi de $71,82 \pm 1,50\%$, sendo às 36 horas de $70,71 \pm 1,88\%$ (tabela 15 – experimento I).

Rozeboom (2000) considera normal uma motilidade acima de 70% para o sêmen suíno. Assim, os valores de motilidade se mantiveram normais até as 24 horas de armazenamento e, embora tenha havido uma redução numérica dos seus valores às 36 horas de armazenamento, não se observaram diferenças ($p > 0,05$) entre eles (tabela 22). Além disso, Flowers (1997) afirmou que só haverá prejuízo ao desempenho reprodutivo, quando do uso de doses inseminantes apresentando motilidade inferior à 60%.

Na tabela 23 estão apresentados os dados referentes ao vigor espermático para os tratamentos 1 e 2, do experimento II. Embora não tenha havido efeito do tratamento ($p > 0,05$) sobre o vigor, nos diferentes períodos de avaliação, observou-se influência ($p < 0,05$) do período de estocagem do sêmen sobre seus valores.

O sêmen a fresco apresentou um vigor médio de $3,71 \pm 0,09$ no experimento II (tabela 23), numericamente superior ao observado no experimento I (tabela 16-experimento I), mas ainda inferior aos valores descritos por Alkmin (2010), quando se observou um valor médio, na P1 de $4,70 \pm 0,11$. Deve-se levar em consideração que os valores de vigor para o sêmen a fresco, neste experimento, referem-se às avaliações realizadas no sêmen heterospérmico, ou seja, oriundo de dois machos submetidos à coletas fracionadas dos primeiros 15 mL da fração rica (somando 30 mL), pré-diluídos em 30 mL do diluidor GGO (1:1). Ao contrário, no trabalho conduzido por Alkmin (2010), as avaliações se referem ao sêmen *in natura* de apenas um macho, imediatamente após a coleta fracionada (15 mL da fração rica).

Não foi observada queda do vigor no tempo 0h ($p > 0,05$) em relação ao do sêmen a fresco para nenhum dos dois tratamentos, ou seja, a diluição para as concentrações referentes a cada tratamento não influenciou os seus valores (tabela 23). Comportamento similar foi observado no experimento I (tabela 16).

Nas doses referentes ao E2T1-24B, os valores de vigor se mantiveram sem alteração ($p > 0,05$), em relação aos observados no sêmen a fresco até às 12 horas de armazenamento, observando-se uma redução ($p < 0,05$), após a rediluição ($3,70 \pm 0,13$ vs $3,22 \pm 0,14$). Estes resultados diferem do que foi observado no experimento I, quando os valores de vigor não diferiram ($p > 0,05$) dos apresentados para o sêmen a fresco, até as 24 horas de armazenamento, de modo que o único valor a diferir destes envolveu os do sêmen armazenado até as 36 horas (tabela 16-experimento I).

Tabela 23: Comportamento do vigor espermático no sêmen diluído, resfriado à 5°C e armazenado em contêiner especial, oriundo de doses heterospérmicas hiperconcentradas (24×10^9 de espermatozoides/dose), antes e após a rediluição para doses padrão ou de doses heterospérmicas padrão (3×10^9 de espermatozoides/dose) avaliadas à diferentes períodos de tempo após a coleta

Tratamento	Períodos de avaliação					
	Fresco	Zero horas	12 horas	Rediluição	24 horas	36 horas
E2T1-24B	3,70±0,13 ^{aA}	3,65±0,13 ^{abA}	3,33±0,14 ^{abcA}	3,22±0,14 ^{bcd}	3,00±0,14 ^{cdA}	2,75±0,17 ^{dA}
E2T2-3B	3,73±0,13 ^{aA}	3,45±0,13 ^{abA}	3,27±0,13 ^{bcA}	—	3,11±0,14 ^{bcA}	2,90±0,19 ^{cA}
Total	3,71±0,09	3,55±0,09	3,30±0,09	3,22±0,14 ^{bcd}	3,06±0,10	2,82±0,13

^{a,b}Médias acompanhadas por letras minúsculas distintas na mesma linha diferem entre si ($p < 0,05$)

Os valores de vigor espermático, observados às 24 horas de armazenamento, foram sempre inferiores ($p < 0,05$) aos do sêmen a fresco para os dois tratamentos no experimento II (tabela 23), condição também observada por Alkmin (2010). Além disso, Siqueira (2011) ao trabalhar com doses contendo 6, 9 ou 12 bilhões de espermatozoides móveis, oriundas do ejaculado total, observou também uma queda do vigor espermático após 24 horas de armazenamento à 5°C, para as doses contendo 6 e 9 bilhões, sendo que para as doses contendo 12 bilhões, observou-se uma queda dos seus valores, após 36 horas de estocagem.

A rediluição não causou redução ($p > 0,05$) dos valores de vigor, em relação aos observados no sêmen 0 horas. Além disso, não se observaram diferenças ($p > 0,05$) entre o sêmen pré-rediluição (hiperconcentrado) e o sêmen pós-rediluição (doses contendo 3 bilhões de espermatozoides móveis) até as 24 horas de estocagem do sêmen. Assim, o vigor pré-rediluição (12 horas) só diferiu ($p < 0,05$) dos valores observados às 36 horas de armazenamento. No entanto, após a rediluição, os valores se mantiveram similares ($p > 0,05$) até as 36 horas de armazenamento. O mesmo comportamento foi observado no experimento I para a variável vigor (tabela 16).

Em contrapartida, observou-se uma redução do vigor já às 12 horas de estocagem, em relação ao observado no sêmen a fresco, para o E2T2-3B ($3,27 \pm 0,13$ vs $3,73 \pm 0,13$, $p < 0,05$). Além disso, observou-se que os valores foram similares ($p > 0,05$) de 0h até as 24 horas de estocagem, havendo uma redução significativa apenas às 36 horas, em relação aos valores do sêmen a fresco e do avaliado às zero horas, que não diferiram ($p > 0,05$) entre si. No experimento I, o vigor do grupo controle (E2T2-3B) se manteve similar ao do sêmen a fresco até as 24 horas, quando então diferiu ($p < 0,05$) dos observados para o sêmen a fresco e o sêmen zero horas, que no entanto não diferiram ($p > 0,05$) entre si. Ainda, os valores observados nos tempos 24 e 36 horas se equivaleram ($p > 0,05$).

Deve-se enfatizar que as variáveis motilidade e vigor espermáticos apresentaram uma queda progressiva dos seus valores acompanhando o tempo de estocagem das doses nos Experimentos I e II (tabelas 15, 16 – experimento I; tabelas 22, 23 – experimento II). No entanto, embora tenha havido uma redução da motilidade do sêmen, após a rediluição, nas doses contendo 24 bilhões de espermatozoides, os valores se mantiveram sempre superiores à 70% até as 24 horas de estocagem, mantendo-se superior à 70% até

as 36 horas, para as doses de 15 bilhões, no experimento I (tabela 15).

Além disso, o comportamento do vigor foi muito similar entre os dois experimentos para o sêmen hiperconcentrado, quando foram observados valores superiores a 3 por até 24 horas de estocagem (tabelas 16 e 23- experimentos I e II, respectivamente). Assim, a utilização de doses hiperconcentradas contendo 15 ou 24 bilhões, submetidas a uma rediluição dentro de um tempo médio de 12 horas após a coleta, possibilitou a manutenção de uma motilidade próxima de 70%, até as 36 horas após a coleta do sêmen, sendo este mantido a 5°C e diluído em GGO (Foote, 2002).

O tempo transcorrido da coleta do sêmen à rediluição das doses hiperconcentradas foi muito similar entre os experimentos, sendo de 13,31 horas para o experimento II e de 11,89 horas para o experimento I.

A motilidade progressiva e o vigor indicam bom funcionamento metabólico dos espermatozoides e, de certa forma, a preservação das membranas plasmáticas intactas. Desta forma, a estimativa da proporção de espermatozoides com motilidade progressiva e do vigor é de fundamental importância no controle diário da qualidade das doses de sêmen (Johnson *et al.*, 2000).

Alterações estruturais e funcionais ocorrem nas células espermáticas durante a estocagem do sêmen resfriado, sendo um processo similar ao envelhecimento natural e que pode ser determinado pelas condições e duração da estocagem. Do ponto de vista prático, não há como se evitar a redução da capacidade fecundante das células espermáticas, durante o armazenamento. No entanto, alguns fatores estão associados à redução da fertilidade associada à estocagem do sêmen resfriado, tais como o elevado número de espermatozoides por dose, a presença de plasma seminal e a baixa taxa de diluição, cujos efeitos podem ser aditivos (Johnson *et al.*, 2000).

De acordo com Polge (1956b), a redução da fertilidade do sêmen do varrão, observada após 24 horas de armazenamento, é fator preocupante quando se considera a utilização do sêmen armazenado. No entanto, a temperatura final de armazenamento, a taxa de resfriamento adequada, o tipo de diluidor utilizado podem influenciar diretamente a manutenção da fertilidade do sêmen durante o armazenamento, além da qualidade inerente do sêmen a fresco, antes do seu processamento. Em 1996, Alexopoulos *et al.* observaram uma queda significativa da motilidade do sêmen após 48 horas de armazenamento, embora à temperatura de 17°C.

De Ambrogi *et al.* (2006), por sua vez, observaram uma queda da motilidade espermática após 96 horas de armazenamento.

Durante o processo de resfriamento e congelamento, grande parte dos espermatozoides sofre algum tipo de lesão e morre, sendo um agravante a pronunciada sensibilidade das células espermáticas do varrão ao resfriamento, principalmente quando armazenados à temperaturas inferiores a 15°C (Lasley e Bogart, 1944). Althouse *et al.* (1998) afirmaram que a temperatura crítica para a ocorrência de lesões espermáticas, oriundas do choque térmico no sêmen suíno, é de 12°C. Esta maior sensibilidade está relacionada à maior proporção de ácidos graxos insaturados:saturados nos fosfolípidos da membrana plasmática dos espermatozoides do suíno, associada às baixas concentrações de colesterol na membrana, aliada a uma distribuição assimétrica na mesma (De Leeuw *et al.*, 1990; White, 1993).

A peroxidação é um processo insidioso mais ativo em espermatozoides danificados ou menos móveis (Jones e Mann, 1973; Jones *et al.*, 1979; Aitken e Clarkson, 1987; Slaweta *et al.*, 1988) sendo que os produtos tóxicos formados danificam os

espermatozoides saudáveis (Shannon, 1965; Shannon e Curson, 1972; Sexton, 1988). Desta forma, trata-se de um importante fator a ser considerado quanto à senescência espermática e a sua prevenção, durante a preparação das doses que serão armazenadas.

Os espermatozoides lesados e deteriorados irão contribuir para a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), devido à liberação de ácidos graxos poli-insaturados no meio diluidor, fonte para o início das reações em cadeia da peroxidação lipídica (Silva, 2006), mesmo no sêmen resfriado à baixas temperaturas. Na temperatura ambiente, os efeitos da peroxidação lipídica são ainda mais severos, embora possam ser minimizados pela redução da tensão de oxigênio e pela incorporação de antioxidantes ao diluidor.

Neste sentido, Shannon (1968) estudou o efeito dos teores de oxigênio sobre a sobrevivência espermática. Para tal, diluiu 20 ejaculados de touros em diluidor citrato-gema de ovo, resfriando-os à 5°C, com concentrações de 12,5 ou 200x10⁶ de espermatozoides/mL. De acordo com o autor, houve interação significativa entre o grau de saturação de nitrogênio (N₂), associado à redução da tensão de oxigênio, período de estocagem do sêmen e taxa de diluição. Assim, o efeito da redução da tensão de oxigênio (maior saturação de N₂), impediu o declínio da motilidade espermática acompanhando o aumento do período de estocagem do sêmen, sendo esta proteção mais acentuada no sêmen apresentando altas concentrações, quando do seu armazenamento. Além disso, Shannon (1965, 1968) propuseram a utilização do diluidor Caprogen™, composto de gema de ovo, catalase e saturado com N₂, para o transporte do sêmen de touros hiperconcentrado. Tal protocolo permitiu que o transporte fosse realizado à temperatura ambiente, e que o sêmen fosse armazenado por 4 dias,

resultando em taxas de não retorno ao cio de 60-70%.

Windson *et al.* (1993) demonstrou que espermatozoides de carneiro, armazenados à uma concentração de 1x10⁸ espermatozoides/mL, responderam negativamente à incubação com 400µM de HNE (hidroxinonenal, produto da peroxidação lipídica, sendo uma molécula muito ativa e destrutiva), quando observou-se bloqueio da motilidade em 60 minutos. Concentrações de 200µM de HNE resultaram em um bloqueio da motilidade dentro de 120 minutos. O efeito não é apenas dose dependente, pois depende também da concentração espermática. Desta forma, quando os espermatozoides foram armazenados à concentrações de 1x10⁹ espermatozoides/mL, resistiram à incubação com concentrações superiores à 200µM de HNE, por mais de duas horas, sem que houvesse redução da motilidade.

Vários trabalhos têm estabelecido que na espécie suína, os espermatozoides oriundos da primeira porção (10-15 mL) da fração rica em espermatozoides ou P1, são aqueles que melhor sobrevivem à manipulação laboratorial, tais como diluição, resfriamento e congelamento (Sélles *et al.*, 2001; Peña *et al.*, 2003; Peña *et al.*, 2004a; Alkmin, 2010). Além disso, Saravia (2008) congelou o sêmen suíno oriundo da P1 do ejaculado hiperconcentrado (2x10⁹ espermatozoides/mL) em MiniFlatPacks® (0,5 mL de volume) e não observou diferenças significativas quanto à motilidade e o vigor espermáticos entre as doses congeladas hiperconcentradas e o grupo controle (FlatPacks®, 5mL).

Diante dos resultados apresentados pela literatura consultada, e dos obtidos nos experimentos I e II, pode ser observado que os espermatozoides oriundos da primeira porção da fração rica em espermatozoides do ejaculado de varrões foram mais resistentes à manipulação, tais como a diluição e o resfriamento; a utilização da

coleta fracionada garantiu menor proporção de células lesadas e deterioradas após o resfriamento, hiperconcentração e posterior rediluição. Tais condições associadas à redução da tensão de oxigênio, pela maior concentração espermática por mL de sêmen diluído, nas doses hiperconcentradas garantiram a manutenção da viabilidade do sêmen durante o período de armazenamento à 5°C, previamente a rediluição.

No experimento II, o número de espermatozoides totais e de espermatozoides móveis, observados na P1 (tabela 24), também referentes aos primeiros 15 mL da fração rica de dois varrões (30 mL), foram de $42,08 \pm 2,31$ bilhões de espermatozoides totais e de $36,35 \pm 1,90$ bilhões de espermatozoides móveis para o E2T1-24B. Valores menores foram encontrados para o E2T2-3B, sendo de $41,11 \pm 2,30$ e $35,48 \pm 1,93$ bilhões de espermatozoides totais e móveis, respectivamente. Estes valores são superiores aos observados no experimento I. Estas diferenças podem estar associadas à mudança na combinação de machos para a formação das duplas, de forma a garantir uma melhor distribuição da frequência de sua utilização nos dois tratamentos, no transcorrer do experimento II (tabela 20), tal como foi mencionado anteriormente no experimento I.

De acordo com Garner e Hafez (1996), a concentração espermática média da fração rica do ejaculado varia de 500 a 1000×10^6 de espermatozoides/mL, sendo no ejaculado total de $386,18 \times 10^6$ espermatozoides/mL (Braga, 2007).

No trabalho de Alkmin (2010), envolvendo a coleta fracionada de 10 ejaculados de cinco varrões da raça Landrace, a concentração total média de espermatozoides foi de $25,38 \pm 2,77$ bilhões de espermatozoides (primeiros 15 mL). Entretanto, de acordo com Saravia *et al.*

(2010), a concentração total média de espermatozoides presentes nos primeiros 10 mL da fração rica foi de 16 bilhões, respondendo por 23,4% do número total médio de espermatozoides da fração rica total, que foi de $68,4 \times 10^9$. Já Siqueira *et al.* (2011) observaram uma concentração espermática média de $1,86 \pm 0,20 \times 10^9$ de espermatozoides/mL, também nos primeiros 10 mL da fração rica. Desta forma, as concentrações observadas nos experimentos I e II são superiores às descritas na literatura. Há que se enfatizar, entretanto, que todos os trabalhos mencionados anteriormente (Alkmin, 2010; Saravia *et al.*, 2010; Siqueira *et al.*, 2011) envolveram a coleta de apenas um varrão, enquanto os dados dos experimentos I e II, da presente dissertação, envolveram a coleta fracionada de dois machos (tabelas 17 e 24).

Para a eficiência de um programa de inseminação artificial, um fator que deve sempre ser considerado é a concentração do sêmen do macho destinado à reprodução, cuja estimativa deve ser precisamente determinada. A superestimação significa que a concentração mensurada é maior que a concentração real do ejaculado, o que leva à utilização de um número real inferior de espermatozoides ao número calculado, podendo reduzir o número de espermatozoides colonizando o reservatório espermático (Krueger *et al.*, 1999). Além disso, um volume de diluidor maior que o necessário, será adicionado ao sêmen durante o seu processamento, o que pode ser lesivo aos espermatozoides (Stratman e Self, 1960; Weitze *et al.*, 1990). Estes fatores podem provocar uma redução da fertilidade do rebanho, aumentando as taxas de retorno ao cio devido à falhas de fertilização, ou ainda, pela redução das taxas de parto e do tamanho das leitegadas, podendo gerar enormes prejuízos ao criador (Vianna *et al.*, 2004).

Tabela 24: Características espermáticas da porção um (primeiros 15mL) do sêmen heterospérmico oriundo de dois varrões submetidos à coleta fracionada, bem como o seu rendimento quanto ao número de fêmeas inseminadas – Experimento II

Características avaliadas	Tratamentos	
	E2T1-24B	E2T2-3B
Volume de sêmen (mL)	20,24 ± 0,96 ^a	2,60 ± 0,13 ^b
Motilidade espermática (%)	86,50 ± 0,76	86,36 ± 0,70
Espermatozóides por mL (x10 ⁶)	701,25 ± 38,48	685,23 ± 38,32
Espermatozóides móveis por mL (x10 ⁶)	605,75 ± 31,72	591,25 ± 32,15
Total de espermatozóides na fração 1 (x10 ⁹)	42,08 ± 2,31	41,11 ± 2,30
Total de espermatozóides móveis na fração 1 (x10 ⁹)	36,35 ± 1,90	35,48 ± 1,93
Nº total de espermatozóides por dose (x10 ⁹)	27,73 ± 0,24 ^a	3,47 ± 0,03 ^b
Nº total de espermatozóides móveis por dose (x10 ⁹)	23,97 ± 0,01 ^a	2,99 ± 0,004 ^b
Nº de doses produzidas (30 mL de sêmen)*	8,00 ± 0,00**	3,91 ± 0,06
Nº real de fêmeas inseminadas	2,90 ± 0,38	2,55 ± 0,25 ^a

^bMédias acompanhadas por letras diferentes na mesma linha, diferem entre si (p<0,05)

*Doses produzidas pelo sêmen heterospérmico oriundo dos primeiros 15 mL da fração rica de dois machos (30 mL de sêmen)

**O número de doses produzido era fixo, por isso não há erro padrão da média (8,00±0,00).

Quando a concentração mensurada for menor que a concentração real, haverá, da mesma forma, prejuízos pelo aumento do custo de produção de cada dose, resultante da menor produção de doses por ejaculado. Além disso, o número de espermatozoides utilizados por dose inseminante será superior ao calculado, o que pode mascarar falhas no manejo reprodutivo dos machos (Vianna *et al.*, 2004).

A contagem da concentração espermática pela utilização da câmara de Neubauer é uma avaliação precisa, apesar de exigir maior tempo de análise e microscópio adequado (Billard e McDaniel, 1985; Paulenz *et al.*, 1995). Trata-se de uma técnica recomendada pela “World Health Organization” (WHO) (Paulenz *et al.*, 1995; Steverink *et al.*, 1999). Todavia, segundo Evenson *et al.* (1993), a precisão da contagem na câmara não é exata, havendo diferenças de até 20% entre a contagem duplicada de uma mesma amostra, pelo mesmo técnico. Por outro lado, Paulenz *et al.* (1995) apontam

coeficiente de variação de 12,3% e Sokol *et al.* (2000) de apenas 10%. Além disso, o aumento da diluição do sêmen para a contagem pode estar associado à redução de sua precisão, devido à sobreposição e desuniformidade quando do preenchimento da câmara.

Neste sentido, Alkmin (2010) utilizou uma taxa de diluição de 1:800 (10µL de sêmen: 8 mL de formol salina) para a contagem em câmara de Neubauer espelhada. Na presente dissertação, tanto para o experimento I quanto para o experimento II, utilizou-se uma taxa de diluição de 1:1000 (10µL de sêmen: 10 mL de formol). A taxa de diluição indicada para o ejaculado total do varrão é de 1:100, ou seja, os dois trabalhos utilizaram uma taxa de diluição acima da recomendada pela literatura.

No entanto, os resultados relacionados à fertilidade e prolificidade das fêmeas suínas inseminadas, tanto no presente experimento quanto no trabalho de Alkmin (2010) não

indicam a possibilidade de erros na contagem da concentração espermática.

Existem outros fatores que podem afetar a concentração espermática de um ejaculado, valendo salientar a raça (Kommisrud *et al.*, 2002), o volume do ejaculado (Kondracki, 2003), bem como a grande variação existente entre indivíduos de uma mesma raça (Johnson *et al.*, 2000). Além disso, Smital (2009) afirmou que a frequência de coletas tem efeito significativo sobre o volume e a concentração espermática, sendo que a concentração e o número total de espermatozoides no ejaculado são restabelecidos após 5-7 dias de descanso depois da última coleta. Entretanto, o restabelecimento completo da concentração espermática só foi alcançado após um repouso sexual de 10-11 dias. Além disso, Falkenberg e colaboradores (1992) afirmam que o intervalo ideal entre coletas é de 2 a 5 dias e indicam que uma maior frequência de ejaculação tende a reduzir não apenas a concentração mas também a libido dos machos.

O intervalo médio entre coletas para o experimento II foi de 4,5 dias (2 a 7 dias), sendo que para a maioria dos machos as coletas foram realizadas à intervalos de três dias, média inferior ao período sugerido por Smital (2009), de 5 a 7 dias. Entretanto, se consideradas isoladamente, foram realizadas dentro de limites aceitáveis, ainda que fugindo do intervalo indicado para o completo restabelecimento, sugerido pelo mesmo autor.

A idade também é de fundamental importância para a concentração espermática. Em geral, os machos alcançam a puberdade entre 5 e 8 meses de idade, tendo aos 7,5 meses um melhor desempenho quanto ao salto no manequim, evento mais relacionado à idade do que ao peso. A fertilidade do macho jovem é relativamente baixa, imediatamente após a puberdade, não alcançando o máximo até a idade de 12-18 meses. No que diz respeito

ao volume do ejaculado e ao número total de espermatozoides, observou-se um aumento gradual entre 7 e 12 meses de idade, embora os valores máximos não sejam atingidos até aproximadamente os três anos de idade (Deschamps *et al.*, 1998). Falkenberg *et al.* (1992) afirmam que a produção espermática é ótima ao final do crescimento corporal, aos 2,5-3 anos de idade. Dentre os nove machos utilizados no presente experimento, apenas dois machos tinham idade inferior a dois anos.

Polge (1956b), dentre outros autores, observou que a sobrevivência das células espermáticas do varrão, durante o armazenamento, é influenciada pela taxa de diluição do sêmen. No entanto, as opiniões são controversas a respeito da taxa de diluição ideal. De acordo com Perez Marcos *et al.* (1991), a taxa de diluição depende das características do diluidor utilizado, tais como do pH, da pressão osmótica e da sua capacidade tamponante. Normalmente, a taxa de diluição utilizada para o processamento do ejaculado do varrão é de 1:10 (Johnson *et al.*, 2000).

Borton *et al.* (1965) citaram que o sêmen do varrão pode ser submetido à altas taxas de diluição, enquanto Polge (1956a) e Niwa *et al.* (1959) estabeleceram que taxas de diluição acima de 1:10 são lesivas aos seus espermatozoides.

No experimento II, para o E2T1-24B utilizou-se 24 bilhões de espermatozoides distribuídos em uma dose de 100mL. Como o volume médio de sêmen foi de $20,24 \pm 0,96$ mL a taxa de diluição utilizada foi de 1:4. Para as doses padrão, contendo 3×10^9 espermatozoides referentes ao T2, o volume médio de sêmen foi de $2,60 \pm 0,13$ mL por dose, resultando em uma taxa de diluição sêmen:diluidor de 1:37.

Pode ser observado que para o T2 de ambos os experimentos (E1T2-3B e E2T2-3B), o volume médio de sêmen para a preparação das doses foi de $2,89 \pm 0,16$ e $2,60 \pm 0,13$ mL de sêmen para os experimentos I e II,

respectivamente. Assim, as taxas de diluição foram similares (1:34 E1 vs 1:37 E2). No entanto, a taxa de diluição utilizada no T1 do Experimento I superou a utilizada no T1 do experimento II (1:6 - E1 vs 1:4 - E2), como era de se esperar, devido ao maior número de espermatozoides utilizados no T1 do experimento II (24 bilhões de espermatozoides/dose, pré-rediluição).

Diferentemente do que se observou no E1T1-15B, as taxas de diluição do E2T1-24B estão abaixo do mínimo considerado aceitável por Ruvalcaba (1994). Flowers (1996) e Levis (1997) afirmam que taxas de diluição inferiores a 1:5 provocam redução da viabilidade espermática devido à carência de substratos energéticos e à perda da capacidade tamponante do meio, resultante do excesso de células espermáticas por mL de diluidor, havendo maior acúmulo de produtos tóxicos oriundos do metabolismo celular. No entanto, vários autores consideram taxas de diluição menores como as mais adequadas para os espermatozoides do varrão, tais como DuMesnil du Buisson e Signoret (1971), Kolitsch e Stahr (1977) e König (1979), que reportaram taxas de diluição variando de 1:2 a 1:8 como as ideais. Além disso, Kim *et al.* (1976, 1977) consideram uma taxa de diluição de 1:3 como ótima, enquanto Cerovsky (1982) considera uma taxa de diluição de 1:4 como a ideal.

Recentemente, Siqueira (2011) trabalhando com doses oriundas do ejaculado total utilizou taxas de diluição de 1:4,8; 1:2,9 e 1:1,2 para a preparação de doses contendo 6, 9 ou 12 bilhões de espermatozoides/dose de 100mL. Segundo a autora, o aumento da concentração espermática de 6 ou 9 bilhões/100mL para 12 bilhões/100mL não afetou a viabilidade espermática dos espermatozoides armazenados, sendo todos capazes de manter a viabilidade por até 60 horas de estocagem à 5°C.

Do mesmo modo, observou-se que as altas taxas de diluição utilizadas na preparação das doses referentes ao T2, nos dois experimentos (1:34 - E1 e 1:37 - E2), estão acima do valor máximo indicado pela literatura de 1:10, de acordo com Polge (1956a), Niwa *et al.* (1959) e Johnson *et al.* (2000); e de 1:15 como indicado por Flowers (1996) e Levis (1997). Segundo estes autores, altas taxas de diluição provocam uma redução da viabilidade espermática pela ocorrência do choque osmótico.

O chamado “efeito diluição” descrito por Maxwell e Johnson (1999), ocorre quando há diluição excessiva, resultando na perda permanente da motilidade, da atividade metabólica e da capacidade fertilizante *in vivo*. Vale ressaltar, neste momento, que Alkmin (2010), trabalhando com doses padrão de 3 bilhões de espermatozoides, utilizou 2,76mL de sêmen da P1 (primeiros 15mL da fração rica) para a preparação de doses de 100mL. Desta forma, utilizou uma taxa de diluição de 1:35 (sêmen:diluidor), valor muito similar às taxas de diluição observadas no T2, dos experimentos I e II. Já Siqueira (2011), realizou um experimento utilizando a coleta do ejaculado total e uma taxa de diluição de 1:10,6; quando da preparação de doses contendo 3 bilhões de espermatozoides/100mL. A taxa de diluição utilizada pela autora corresponde à descrita por Johnson *et al.* (2000) como a ideal para o processamento do ejaculado total (1:10). Diante dos resultados apresentados anteriormente, observou-se que as diferenças existentes nas taxas de diluição, entre o trabalho atual, o conduzido por Alkmin (2010) e o de Siqueira (2011), justificam-se pela maior concentração espermática/mL observada na P1 da fração rica do sêmen.

Maxwell e Johnson (1999) afirmaram que os efeitos lesivos relacionados às altas taxas de diluição podem ser minimizados pelo uso de diluidores contendo gema de ovo,

como demonstrou-se nos experimentos conduzidos por Alkmin (2010), Siqueira (2011) e no presente trabalho.

Além disso, Varner *et al.* (1987) trabalhando com sêmen de garanhões, observaram ser mais importante o número de células espermáticas por mL de sêmen diluído do que a taxa de diluição utilizada. Segundo estes autores, este número deve permanecer entre 30 e 50 milhões de espermatozoides/mL de sêmen diluído. Desta forma, as doses do T2, para ambos os experimentos, continham 30 milhões de espermatozoides/mL e obedeceram a essa premissa. Entretanto, para as doses referentes ao T1 do experimento I, utilizou-se 150 milhões de espermatozoides/mL, uma concentração três vezes acima do limite máximo indicado, enquanto nas doses do T1 do experimento II, utilizou-se 240 milhões de espermatozoides/mL, ou seja, uma concentração 4,8 vezes acima do limite máximo recomendado por Varner *et al.* (1987).

Fica clara a ausência de concordância à respeito das taxas de diluição apresentadas como ótimas pela literatura, bem como do número ideal de espermatozoides por mL de sêmen diluído, diante dos dados apresentados nos experimentos I e II, quanto à manutenção da viabilidade espermática. Especula-se, neste momento, a importância da qualidade do diluidor utilizado (Maxwell e Johnson, 1999), além é claro, da qualidade do sêmen a ser processado.

Como esperado, o número de espermatozoides totais e móveis por dose (tabela 24) diferiu ($p < 0,05$) entre os tratamentos, sendo de $27,73 \pm 0,24$ bilhões de espermatozoides totais e $23,97 \pm 0,01$

bilhões de espermatozoides móveis para o T1, e de $3,47 \pm 0,03$ bilhões de espermatozoides totais e $2,99 \pm 0,004$ bilhões de espermatozoides móveis para o T2.

Observou-se ainda que o número de doses produzidas para o T1 foi invariavelmente de 8, sendo o número médio de doses produzidas para o T2 de $3,91 \pm 0,06$. Este número foi inferior ao número médio de doses produzidas para o T2 do experimento I, sendo este fato justificado pela maior concentração espermática utilizada para o T1 no experimento II.

Apesar da discrepância entre o número de doses produzidas entre os dois tratamentos, o número real de fêmeas inseminadas não diferiu ($p > 0,05$) entre os mesmos. Assim, observa-se que o número de fêmeas inseminadas foi inferior ao número de doses produzidas para os dois tratamentos ($2,90 \pm 0,38$ T1 vs $2,55 \pm 0,25$ T2), que não diferiram ($p > 0,05$) no que diz respeito à esta variável (tabela 24).

Assim, como explicado no experimento I, a realização das inseminações dependia do número de fêmeas selecionadas, para os dois tratamentos que apresentavam cio no momento adequado, bem como do número de doses disponíveis para inseminá-las. Como o número de doses apresentado na tabela 24 é o número médio, ou seja, resultado da soma das doses produzidas em todas as coletas pelo número de coletas, houve coletas em que o número de doses produzidas foi inferior à três. Desta forma, como a uniformidade entre os tratamentos deveria ser sempre mantida, o número de fêmeas inseminadas para o T1 era mantido sempre próximo ou igual ao número de fêmeas inseminadas para o T2.

4.2.2. Parâmetros de controle, fertilidade e prolificidade das fêmeas suínas inseminadas com doses seminais heterospérmicas hiperconcentradas (24 bilhões de espermatozoides por dose) rediluídas após 12 horas de armazenamento a 5°C para doses padrão (3 bilhões) e de fêmeas inseminadas com doses seminais heterospérmicas padrão armazenadas por 12, 24 e 36 horas após a coleta

Os parâmetros de controle das fêmeas suínas inseminadas no experimento II estão apresentados na tabela 25. Neste experimento, foram utilizadas 20 fêmeas DB25[®] de primeira ordem de parto, sendo 10 fêmeas inseminadas para cada tratamento (tabela 26).

Não houveram diferenças ($p>0,05$) entre os tratamentos para o intervalo entre o início do cio à inseminação artificial, com relação a nenhuma das quatro inseminações (tabela 25). Isto demonstra que todas as fêmeas foram inseminadas em momentos similares ($p>0,05$) entre os tratamentos, não sendo esta uma fonte de variação a ser considerada quando da avaliação do desempenho reprodutivo das fêmeas.

No que concerne ao E2T1-24B, envolvendo a rediluição das doses hiperconcentradas, não observou-se diferenças ($p>0,05$) para o intervalo da coleta do sêmen à rediluição, entre as inseminações, nem para o intervalo da rediluição à realização da inseminação, para as quatro inseminações ($p>0,05$, tabela 25).

Entretanto, o intervalo entre a coleta de sêmen e a inseminação apresentou diferenças ($p<0,05$) entre os tratamentos para a segunda inseminação, quando observou-se maior intervalo para o T1 ($27,11\pm 0,14$ vs $22,69\pm 1,80$ horas).

O tempo médio transcorrido da coleta do sêmen à rediluição foi de 13,31 horas, superior ao tempo observado no experimento I (11,89 horas). Quanto ao intervalo de tempo da rediluição à IA, foi de 12,69 horas, variando de 6 à 19 horas aproximadamente, tempo curto mas superior ao observado no experimento I (11,11 horas).

Devido à rotina de coleta da granja onde foram realizados os experimentos, não foi possível a coleta de várias duplas de machos em um mesmo momento para que algumas doses permanecessem armazenadas após a rediluição por maior período. Deste modo, as coletas eram realizadas no decorrer dos dias de inseminações, de forma que algumas fêmeas foram inseminadas imediatamente após a rediluição do sêmen, reduzindo o tempo médio transcorrido, da rediluição às inseminações, nos dois experimentos.

Os intervalos entre as inseminações foram obedecidos para todos os tratamentos, dentro das inseminações, não havendo diferenças ($p>0,05$ -tabela 25) entre as IA's, com relação à esta variável, no experimento II.

Tabela 25: Parâmetros de controle de fêmeas inseminadas com sêmen diluído e resfriado, oriundo de doses heterospermicas hiperconcentradas (24×10^9 espermatozoides/dose) e rediluídas após 12 horas de armazenamento a 5°C , para doses padrão, antes das inseminações artificiais ou de doses heterospermicas padrão (3×10^9 espermatozoides/dose)

Parâmetros de controle	Primeira IA		Segunda IA		Terceira IA		Quarta IA	
	T1 (24×10^9)	T2 (3×10^9)	T1 (24×10^9)	T2 (3×10^9)	T1 (24×10^9)	T2 (3×10^9)	T1 (24×10^9)	T2 (3×10^9)
Tempo da coleta à IA (horas)	18,93 ± 2,54	17,19 ± 2,35	27,11 ± 0,14 ^a	22,69 ± 1,80 ^b	26,97 ± 0,20	24,31 ± 7,57	30,93 ± 2,49	28,06 ± 1,73
Início do cio à IA (horas)	11,54 ± 0,76	11,61 ± 0,65	25,61 ± 0,20	25,73 ± 0,22	35,13 ± 0,67	35,00 ± 0,74	49,11 ± 0,14	49,56 ± 0,45
Motilidade do sêmen (%)	73,00 ± 1,53	77,00 ± 1,70	70,50 ± 0,50	72,50 ± 1,54	73,00 ± 0,82	73,00 ± 1,53	70,00 ± 0,00	74,00 ± 2,45
Vigor espermático (0-5)	3,30 ± 0,15	3,50 ± 0,17	3,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00	3,10 ± 0,01	3,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00
Duração da IA (minuto)	25,30 ± 2,15	26,40 ± 3,15	25,40 ± 2,15	24,60 ± 3,85	16,30 ± 2,56	20,80 ± 2,91	17,63 ± 2,87	17,40 ± 2,46
Tempo da coleta à rediluição (horas)	12,97 ± 0,80	---	11,74 ± 0,56	---	16,25 ± 0,61	---	12,28 ± 0,90	---
Tempo da rediluição à IA (horas)	5,96 ± 2,03	---	15,36 ± 0,59	---	10,77 ± 0,57	---	18,66 ± 1,69	---
Intervalo entre IAs (horas)	---	---	13,87 ± 0,63	14,02 ± 0,51	9,51 ± 0,57	9,15 ± 0,68	13,81 ± 0,94	13,95 ± 1,04
Intervalo última IA ao final do cio (horas)	---	---	---	---	13,96 ± 0,01	13,67 ± 0,19	16,25 ± 3,05 ^a	8,22 ± 1,14 ^b

^{a,b}Médias seguidas por letras distintas na mesma linha, dentro de cada inseminação artificial, diferem entre si ($p < 0,05$)

No entanto, para a quarta inseminação houve diferenças ($p < 0,05$) entre os tratamentos, para o intervalo da última inseminação ao final do cio. Assim, as fêmeas pertencentes ao E2T1-24B foram inseminadas às $16,25 \pm 3,05$ horas antes do seu final, enquanto nas fêmeas do E2T2-3B este intervalo foi de apenas $8,22 \pm 1,14$ horas ($p < 0,05$). Apesar do número de inseminações não ter diferido entre os tratamentos (tabela 26), o menor intervalo observado entre a última IA e o final do cio, nas fêmeas do E2T2-3B, pode justificar a taxa de gestação numericamente inferior ($p > 0,05$) para este tratamento em relação ao E2T1-24B (tabela 26).

Vários trabalhos têm relatado que quando mais de três inseminações são realizadas durante o cio da porca, a última destas múltiplas inseminações pode ocorrer no final do estro ou já no metaestro, resultando em uma redução da taxa de parto (Rozeboom *et al.*, 1997; Soede *et al.*, 2000). Um agravante foi a menor duração do cio ($p < 0,05$) observada nas fêmeas do E2T2-3B ($52,90 \pm 1,79$ horas) em relação às do E2T1-24B ($61,63 \pm 3,16$ horas), como observado na tabela 26. Steverink *et al.* (1999) relataram que melhores taxas de parto e maior número de leitões nascidos são observadas em granjas onde os estros são mais longos.

Em suínos, grande volume de sêmen é depositado no útero, quando das inseminações artificiais e na monta natural, induzindo uma forte resposta inflamatória, caracterizada por grande influxo de neutrófilos, já às duas horas após as inseminações (Lovell e Getty, 1968; Rodriguez-Martinez *et al.*, 1990). Para garantir um ótimo desenvolvimento embrionário, o excesso de sêmen, bem como os produtos inflamatórios, precisam ser eliminados do útero (Pope *et al.*, 1990). Este mecanismo de limpeza uterina pode estar relacionado à atividade miometrial em porcas, assim como está devidamente

estabelecido em éguas (Troedsson *et al.*, 1993). No entanto, a motilidade uterina diminui dramaticamente ao final do estro em porcas (Bower *et al.*, 1974), o que pode explicar a menor taxa de gestação observada nas porcas inseminadas próximo ao final do cio, como observou-se nas fêmeas do E2T2-3B. Há que se salientar, entretanto, não ter havido diferenças ($p > 0,05$) entre os tratamentos (tabela 26), quanto à fertilidade e prolificidade das fêmeas.

Desta forma, o número de leitões nascidos totais e vivos não diferiu ($p > 0,05$) entre os dois tratamentos, como demonstrado na tabela 26 e discutido em seguida.

A motilidade e o vigor das doses não diferiram ($p > 0,05$) entre os tratamentos, para nenhuma das inseminações, diferentemente do que observou-se para o experimento I, mantendo-se com valores de motilidade maiores ou iguais à 70% e de vigor igual a 3, em todas as IA's realizadas. Estes valores de motilidade e vigor são considerados como os mínimos necessários para a manutenção de boa capacidade fecundante do sêmen, segundo Flowers (1997) e Levis (1997).

A duração das inseminações também foi similar ($p > 0,05$) para os dois tratamentos e para todas as inseminações. Assim como no experimento I, envolveram um longo período, com valores bem superiores aos descritos por Alkmin (2010), quando duraram entre 4 e 6 minutos.

Os dados referentes ao comportamento do cio, fertilidade e prolificidade de fêmeas suínas inseminadas estão apresentados na tabela 26.

No que se refere ao intervalo desmama-cio (IDC), não observou-se diferenças entre os tratamentos 1 e 2 ($98,85 \pm 0,81$ vs $96,43 \pm 2,64$ horas ou 4,1 vs 4,0 dias para o T1 e T2, respectivamente), durações muito próximas das observadas no experimento I. Killen *et al.* (1992) afirmaram que IDC's

variando de 4 a 6 dias são normais, sendo anormais quando superam os 10 dias. Além disso, este é o IDC padrão observado na maioria das granjas tecnificadas, no presente momento (Vesseur, 1997; Kummer *et al.*, 2003).

Em um trabalho envolvendo fêmeas pluríparas, Braga (2007) observou um IDC médio de $90,38 \pm 17,55$ horas (3,76 dias). Para Alkmin (2010), o IDC das fêmeas distribuídas em dois diferentes tratamentos, variou de $81,14 \pm 3,77$ horas (3,38 dias) a $86,76 \pm 3,77$ horas (3,62 dias). Finalmente, Siqueira (2011) descreveu um IDC médio total de $105,55 \pm 3,74$ horas (4,66 \pm 1,16 dias). Os valores de IDC descritos por Alkmin (2010) e Braga (2007) estão muito próximos dos obtidos no presente trabalho, diferentemente dos valores de IDC observados por Siqueira (2011), bem superiores aos aqui observados.

Ao se comparar os resultados dos experimentos citados acima com os do presente experimento, alguns fatores importantes devem ser considerados. Inicialmente, deve-se enfatizar que os trabalhos de Braga (2007), Alkmin (2010) e Siqueira (2011) foram todos realizados na mesma granja com fêmeas pluríparas. Em segundo lugar, vale salientar a genética das fêmeas utilizadas por eles, uma vez que apenas Alkmin (2010) utilizou fêmeas DB25[®], exclusivamente, como no presente trabalho. Além disso, outros fatores além da genética e da ordem de parto podem influenciar o IDC, embora sejam difíceis de serem comparados entre os diferentes estudos, tais como a duração da lactação, a nutrição, frequência de exposição das fêmeas ao macho, o tamanho da leitegada, a estação do ano e também o manejo (Dial *et al.*, 1992; Einarsson *et al.*, 1998).

Tabela 26: Comportamento do cio, fertilidade e prolificidade de fêmeas suínas inseminadas com sêmen diluído e resfriado, oriundo de doses heterospérmicas hiperconcentradas (24×10^9 espermatozoides/dose) e rediluídas após 12 horas de armazenamento à 5°C, para doses padrão para as inseminações artificiais ou de doses heterospérmicas padrão (3×10^9 espermatozoides/dose inseminante)

Parâmetros Avaliados	Tratamentos	
	E2T1-24B	E2T2-3B
Número de porcas	10	10
Ordem de parto	1	1
Intervalo desmama cio (horas)	$98,85 \pm 0,81$	$96,43 \pm 2,64$
Duração do cio (horas)	$61,63 \pm 3,16^a$	$52,90 \pm 1,79^b$
Número de IA's	$3,80 \pm 0,13$	$3,50 \pm 0,17$
Taxa de gestação (%)	100% (10/10)	80% (8/10)
Taxa de parto (%)	100% (10/10)	80% (8/10)
Número de leitões nascidos vivos	$13,20 \pm 0,90$	$14,88 \pm 1,37$
Número de leitões natimortos	$0,60 \pm 0,34$	$0,63 \pm 0,38$
Número de leitões mumificados	$0,20 \pm 0,13$	$1,00 \pm 0,50$
Número total de leitões nascidos	$14,00 \pm 1,09$	$16,50 \pm 1,43$

^{a,b} Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem entre si ($p < 0,05$)

Nos experimentos I e II, todas as fêmeas inseminadas eram primíparas. Sabe-se, que de um modo geral, o IDC é mais longo para as fêmeas de primeira ordem de parto, em relação às pluríparas (Wilson e Dewey, 1993; Guedes e Nogueira, 2001). Possivelmente, isto se deva, principalmente, à maior sensibilidade das fêmeas primíparas à grande demanda energética durante o final da gestação e da lactação (Guedes e Nogueira, 2001). Fahmy (1981) afirmou que o IDC diminuiu drasticamente após o segundo parto, permanecendo inalterado a partir do terceiro parto.

No que diz respeito à variação genética entre os diferentes trabalhos, sabe-se que a natureza desta variação está na capacidade das porcas em responder a estímulos apropriados, após a desmama. O presente momento envolve uma questão maior, ou seja, quais são os fatores capazes de suprimir esta capacidade e que podem ter variação genética (Ten Napel *et al.*, 1995). Tem sido estabelecido que diferenças observadas entre raças e cruzamentos são as principais causas genéticas da variação do IDC (Fahmy, 1981), sendo que a utilização de cruzamentos resultou em uma redução dos seus valores, havendo efeito significativo da heterose (Aumaitre *et al.*, 1976).

A duração da lactação também tem efeito direto e quadrático sobre o IDC, de modo que a redução dos dias em lactação prolonga este intervalo (Xue *et al.*, 1993). A duração da lactação para as fêmeas utilizadas, no presente experimento, foi de 24 dias na média. Sabe-se que o IDC é mínimo para lactações entre 22 a 27 dias, sendo superior ($p < 0,05$) para lactações menores que 22 dias e maiores que 27 dias (Mabry *et al.*, 1996).

Apesar das variações observadas entre os diferentes experimentos, o IDC permaneceu entre 3 a 4,5 dias. De acordo com Steverink *et al.* (1999), o IDC que possibilita máxima produtividade das matrizes suínas situa-se

entre 3 a 7 dias. Além disso, a redução deste intervalo para menos de 3 dias pode levar à redução da taxa de parição e do número de leitões nascidos vivos, no próximo parto (Steverink *et al.*, 1999).

Ao contrário do observado para o IDC, a duração do cio diferiu ($p < 0,05$) entre os tratamentos, sendo mais uma vez superior nas fêmeas do T1 (tabela 26). Assim como observou-se no experimento I, a duração do cio no experimento II também está dentro do intervalo de variação normal, descrito por Weitze *et al.* (1994) e Soede *et al.* (1995a), de 24 a 96 horas. Vários fatores podem influenciar a duração do cio, tais como o IDC e também a ordem de parto das fêmeas. Rojkittikhun *et al.* (1992) e Weitze *et al.* (1994) afirmaram que um IDC prolongado está relacionado à menor duração do estro. Steverink *et al.* (1999) também afirmaram que a duração do cio diminuiu ($p < 0,05$) quando o IDC aumentou. No entanto, não houve diferenças ($p > 0,05$) entre os IDC's para as fêmeas do T1 e do T2, como descrito acima (tabela 26), nem houve relação inversa entre o IDC e a duração do cio. Para Weitze *et al.* (1994) as porcas que apresentam IDC menor que 4 dias, têm, na média, vinte horas à mais de cio que as fêmeas com IDC entre 4 a 5 dias.

Os valores médios de duração do cio ou estro (DE), para os dois tratamentos, foram similares aos descritos por Braga (2007), de $63,61 \pm 8,81$ horas; por Alkmin (2010) de $61,7 \pm 2,04$ horas e também por Siqueira (2011) de $54,50 \pm 1,23$ horas, apesar dos diferentes intervalos entre a desmama e a manifestação de cio.

No geral, a duração do estro é menor para fêmeas de primeira e segunda ordens de parto, e também para leitoas em relação à porcas pluríparas (Steverink *et al.*, 1999). Assim, observou-se que as porcas deste experimento apresentaram cio de menor duração, numericamente, em relação às porcas dos experimentos conduzidos por Alkmin (2010) e Braga (2007),

principalmente, ao considerar-se a duração média do cio para as porcas referentes ao T2 ($52,90 \pm 1,79$ horas).

Além do IDC e da ordem de parição, Soede e Kemp (1997) afirmaram que 23,3% da variação na DE pode estar relacionado ao componente granja, ou seja, diferenças na interpretação dos sinais de cio, estresse, diferença na qualidade do varrão utilizado para estimular as fêmeas, no momento da detecção do cio (Jongman *et al.*, 1996), raça e condição nutricional de leitoas e porcas, devendo-se, também salientar a experiência das pessoas responsáveis pela detecção do cio. A DE também pode ser influenciada pela genética. Assim, Willemse e Boender (1966) observaram que a variação na DE dentro de um grupo de irmãs, foi significativamente menor do que a variação entre diferentes grupos de irmãs.

A alta variação na DE resulta em alta variação no intervalo entre o início do cio e o momento da ovulação (Soede *et al.*, 1995a), o que justifica o interesse para a observação sistemática de sua duração. Na maioria das porcas, a ovulação ocorre quando transcorridos dois terços do período de cio, sendo que a determinação da duração da DE pode ajudar no estabelecimento de uma melhor estratégia de IA nas granjas (Soede *et al.*, 2011).

Assim como no experimento I, o número de inseminações foi igual entre os tratamentos E2T1-24B e E2T2-3B ($3,80 \pm 0,13$ vs $3,50 \pm 0,17$; $p > 0,05$). Neste sentido, Braga (2007) realizou uma média de $3,41 \pm 0,54$ inseminações; Alkmin (2010) de $3,25 \pm 0,11$ e Siqueira (2011) de $3,09 \pm 0,05$ inseminações. Nota-se que o número médio de inseminações para os dois experimentos, realizados nesta dissertação, são superiores aos demais. No entanto, como discutido anteriormente, os protocolos de inseminação diferiram entre eles. Assim, nos experimentos de Braga (2007), Alkmin (2010) e Siqueira (2011), a quarta inseminação só era realizada se as fêmeas

permanecessem em cio, por no mínimo 24 horas após a terceira IA, enquanto neste experimento, as quartas inseminações foram realizadas em todas as fêmeas em cio, 12 horas após a terceira inseminação.

Normalmente, os protocolos de inseminação em granjas utilizam de duas a três inseminações por cio (Johnson *et al.*, 2000; Bortolozzo e Wentz, 1997). No entanto, Soede *et al.* (2000) não observaram melhoria no desempenho reprodutivo dos rebanhos utilizando inseminações à intervalos de 12 horas, quando comparados aos rebanhos que usavam inseminações a cada 24 horas, indicando que o número de inseminações pode ser reduzido, fator importante quando se busca a otimização do uso de machos dentro de um plantel.

O elevado número de inseminações por ciclo está relacionado à baixa capacidade de previsão do momento da ovulação, e por se procurar a realização de inseminações à intervalos que garantam melhores resultados reprodutivos. De acordo com Soede *et al.* (1995) e Steverink *et al.* (1997), este intervalo corresponde à inseminações realizadas entre 12 e 24 horas antes da ovulação, para as porcas.

A determinação do intervalo entre inseminações, a ser utilizado em um programa de inseminação artificial, sofre a influência de alguns fatores que devem ser considerados com cautela. Dentre eles, vale salientar a temperatura de resfriamento e o período de estocagem do sêmen, devendo ser indicada a redução dos intervalos entre IA's, quando o sêmen a ser utilizado for resfriado e armazenado por maiores períodos de tempo (Soede *et al.*, 2000). Além disso, a duração do cio exerce efeito direto sobre a fertilidade, quando se utiliza um protocolo de inseminação, uma vez que na presença de cios mais longos, há maior chance de se realizar pelo menos uma inseminação, dentro de um intervalo ótimo pré-ovulação.

Desta forma, ao se considerar o desafio ao qual o sêmen foi exposto, nos dois experimentos realizados na presente dissertação, fica claro o motivo da escolha de um protocolo de inseminação mais conservador.

O alto custo dos experimentos realizados a campo tem tornado cada dia mais difícil a sua execução, visando-se avaliar diferentes tratamentos experimentais, principalmente, quando não há parceria com empresas privadas interessadas no desenvolvimento de novas tecnologias. Além disso, no que se refere à fertilidade de tratamentos seminais, o número de experimentos que utilizam a inseminação de fêmeas para avaliação das taxas de gestação, de parto e das características das leitegadas tem diminuído, à medida que novas técnicas moleculares, capazes de avaliar a manutenção das características morfológicas e funcionais dos espermatozoides, de forma mais rápida, são desenvolvidas. Além disso, o tempo também é um complicador, uma vez que experimentos realizados a campo tendem a ser mais demorados, exigirem maior disponibilidade de prazo e também das pessoas envolvidas em sua execução.

No entanto, apesar da facilidade oferecida pelos testes laboratoriais em vigência, deve-se ter em mente que até o presente momento não existe um único teste ou o conjunto deles que seja capaz de garantir a manutenção da capacidade fecundante de uma amostra de sêmen, submetida a algum tratamento experimental, principalmente, quando se leva em consideração as modestas correlações encontradas entre os resultados observados *in vitro* e a fertilidade à campo (Rodriguez-Martinez, 2003). Foote (2003) afirmou que apesar da rápida expansão de técnicas genômicas, moleculares e computadorizadas, a completa compreensão dos fenômenos relacionados à fertilização continua longe de ser alcançada.

Nesse sentido, no presente experimento, avaliou-se a capacidade fecundante dos espermatozoides submetidos aos tratamentos aqui propostos utilizando a inseminação de 20 fêmeas, estando os dados referentes à fertilidade e prolificidade destas fêmeas apresentados na tabela 26.

As taxas de gestação, de parto e as características das leitegadas não foram influenciadas ($p > 0,05$) pelos tratamentos. Assim, das 10 fêmeas inseminadas no T1 (doses heterospérmicas hiperconcentradas contendo 24×10^9 de espermatozoides em 100 mL, e rediluídas após 12 horas de armazenamento à 5°C para doses padrão de 3×10^9), nenhuma retornou ao cio, resultando em uma taxa de gestação de 100%, que foi acompanhada por uma taxa de parição similar (100%) Estes são dados numericamente superiores aos descritos para o T1 do experimento 1 (doses heterospérmicas hiperconcentradas contendo 15×10^9 de espermatozoides em 100 mL, e rediluídas após 12 horas de armazenamento à 5°C para doses padrão de 3×10^9), que apresentou uma taxa de gestação e de parição de 90% (tabela 19 – experimento I).

No entanto, para as fêmeas referentes ao T2 (doses heterospérmicas padrão contendo 3×10^9 em 100 mL e resfriadas à 5°C), as taxas de gestação e de parição foram de 80%. No que se refere ao T2, pertencente ao experimento I, observou-se uma taxa de gestação superior (90%), embora a taxa de parição tenha sido igual à do presente experimento (II), devido ao aborto de uma das fêmeas (tabela 19 – experimento I).

São poucos os trabalhos que avaliaram a fertilidade do sêmen suíno resfriado à 5°C *in vivo*, principalmente devido à pronunciada sensibilidade do sêmen de varrões ao resfriamento para temperaturas inferiores à 15°C. Assim, o desenvolvimento de protocolos de resfriamento do sêmen à 5°C só foi possível quando houve o desenvolvimento de

diluidores capazes de conferir proteção adequada às células espermáticas. No entanto, Roy (1955), Polge (1956a), DuMesnil du Buisson (1956), DuMesnil du Buisson e Dauzier (1956) e Dziuk (1958) já afirmavam que os diluidores capazes de melhor preservarem a motilidade do sêmen resfriado, pareciam ser aqueles que apresentavam glicose ou glicina associados à gema de ovo ou leite em sua formulação.

A presença de macromoléculas nos diluidores de longa duração confere a proteção necessária às células espermáticas, de forma a garantir sua preservação por até sete dias, além de conferir também proteção contra o choque pelo frio, quando do resfriamento para temperaturas inferiores a 15°C, e especialmente para 5°C (Vyt *et al.*, 2004).

No que diz respeito ao sêmen resfriado a 5°C, Kasuya e Kawabe (1977) ao trabalharem com sêmen resfriado a 5°C ou 15°C, diluídos em diluidor à base de leite em pó desnatado e glicina, observaram que a partir do quarto dia de armazenamento das doses, houve uma redução significativa da motilidade quando o sêmen era mantido a 15°C, enquanto que nas doses mantidas a 5°C, a motilidade se manteve por até sete dias, quando obteve-se 10,2 leitões nascidos.

O número de leitões nascidos totais e vivos não diferiu ($p>0,05$) entre os tratamentos. Para o E2T1-24B observou-se valores de $14,00\pm 1,09$ nascidos totais e $13,20\pm 0,90$ nascidos vivos. Em relação aos dados do E1T1-15B (15 bilhões de espermatozoides nas doses hiperconcentradas), o número de nascidos totais foi $15,11\pm 1,33$ e o de nascidos vivos foi $12,44\pm 1,24$. Diante destes números, observou-se não ter havido perdas significativas no que se refere à prolificidade quando houve aumento da concentração espermática de 15 para 24 bilhões nas doses hiperconcentradas (tabela 19 – experimento I e tabela 26 – experimento II). Para o E2T2-3B, o número

de nascidos totais foi de $16,50\pm 1,43$ e o de nascidos vivos de $14,88\pm 1,37$. Observou-se que os valores relativos à prolificidade das porcas (número total de leitões nascidos e número de leitões nascidos vivos) não diferiram ($p>0,05$) entre os tratamentos (tabela 26).

Ao utilizar o sêmen diluído em diluidor GGO e estocado durante 48 horas à 5°C, Foote (2002) obteve uma taxa de parto de 63%, com uma média de leitões nascidos vivos de 10,8, ao inseminar 70 leitoas e 55 porcas.

No mesmo sentido, Braga (2007) trabalhando com sêmen suíno resfriado à 5°C e diluído, também no diluidor GGO (Foote, 2002), obteve uma taxa de gestação de 77,14%, com um número de leitões nascidos totais de 10,72 e vivos de 10,12. Em um trabalho conduzido por Alkmin (2010), dentro da mesma linha de pesquisa anterior, porém utilizando o sêmen coletado de forma fracionada (primeiros 15 mL), obteve-se uma taxa de gestação de 90%, associada a um número total de nascidos de $13,39\pm 0,85$ e de nascidos vivos de $11,82\pm 0,73$, sendo estes resultados numericamente superiores aos descritos por Foote (2002) e por Braga (2007).

Desde 1956, Polge já afirmava serem os espermatozoides presentes na fração rica do ejaculado do varrão mais resistentes ao resfriamento à 5°C, bem como ao congelamento/descongelamento, quando comparados aos espermatozoides contidos no ejaculado total ou no restante do ejaculado. Tem sido observado, nos últimos anos, que os espermatozoides presentes nos primeiros 10-15 mL da fração rica em espermatozoides do ejaculado ou P1 resistem melhor à manipulação laboratorial, como por exemplo o armazenamento à temperatura ambiente, o resfriamento ou, ainda, o congelamento/descongelamento, do que os espermatozoides presentes no restante do ejaculado ou P2 (Sélles *et al.*, 2001; Peña *et al.*, 2006; Saravia *et al.*,

2007, 2009). Esta maior resistência está relacionada não apenas às características espermáticas, mas principalmente, às diferenças qualitativas e quantitativas na composição protéica do plasma seminal.

De acordo com Saravia *et al.* (2009), o plasma seminal do restante do ejaculado ou P2 consiste quase que exclusivamente de espermadésinas. As espermadésinas são proteínas do plasma seminal e compreendem cinco membros, a AQN-1, AQN-3, AWN', PSP-I e PSP-II, as duas últimas formando o heterodímero PSP-I/PSP-II. O plasma seminal da P1 também contém estas espermadésinas, porém em menores concentrações e com menores pesos moleculares. Apesar de ambas as porções do ejaculado, ou seja, a P1 e P2 conterem espermadésinas, a P1 contém proteínas de origem epididimária que são exclusivas a ela ou encontradas em menores concentrações na P2, indicando que os espermatozoides da P1 continuam expostos à substancial quantidade de fluido da cauda do epidídimo.

Os espermatozoides da cauda do epidídimo resistem melhor ao resfriamento e congelamento/descongelamento do que os espermatozoides ejaculados, o que pode explicar o melhor desempenho dos espermatozoides contidos nessa fração. Assim, a P1 do ejaculado contém a menor concentração de proteínas. Sabe-se, além disso, que as espermadésinas e suas subunidades isoladas exercem atividade quimiotática aos polimorfonucleares (PMN's) *in vitro*, onde o recrutamento de células mononucleares e neutrófilos até a cavidade peritoneal de ratos demonstrou padrão de reação inflamatória (Assreuy *et al.*, 2003). No trabalho desenvolvido por Rodriguez-Martinez *et al.* (2001) foi demonstrado que há efeito do heterodímero PSPI/PSPII na resposta imune uterina, de modo que após a infusão de um isolado do heterodímero em soro fisiológico estéril (3mg/mL, em 100mL), concentração cinco vezes inferior à observada no ejaculado do

varrão, houve a recuperação de um número médio seis vezes maior de PMN's do lúmen uterino das porcas inseminadas com o heterodímero em relação as porcas do grupo controle.

Para Foxcroft *et al.* (2008), a exposição dos espermatozoides à baixas concentrações do heterodímero PSPI/PSPII, os torna capazes de manter a motilidade, a viabilidade e a atividade mitocondrial, quando presentes em ejaculados altamente diluídos.

Além do tipo de coleta, a menor taxa de parto observada por Foote (2002) pode estar relacionada também à velocidade de resfriamento do sêmen. A taxa de resfriamento é o fator mais importante no que se refere à sobrevivência espermática, durante o processo de resfriamento e/ou congelamento do sêmen (Pursel e Parks, 1985; Silva Filho, 1994). No entanto, até 15°C, a taxa de resfriamento não é o fator mais importante para a viabilidade espermática (Weber, 1989). Entretanto, quando do resfriamento de 20°C para 5°C, a taxa ideal de resfriamento deve ser lenta, de -0,005 ou -0,012°C/minuto para o sêmen do garanhão (Kayser *et al.*, 1992). Em um trabalho recente, Juarez *et al.* (2011) resfriaram dois "pools" de cinco ejaculados de 15°C para 5°C a taxas de 0,08°C, 0,13°C, 0,40°C e 1,50°C/minuto. De acordo com os autores, estas taxas de resfriamento não resultaram em diferenças ($p > 0,05$) na motilidade, na integridade da membrana, morfologia acrossomal, na arquitetura lipídica da membrana ou na produção de espécies oxigênio reativas; o que indicaria a possibilidade do resfriamento do sêmen do varrão a taxas mais rápidas.

Foote (2002) resfriou o sêmen da temperatura ambiente para 5°C, dentro de 4 horas, ou seja, à uma taxa de resfriamento rápida. Em contrapartida, nos trabalhos de Braga (2007) e Alkmin (2010), utilizou-se o contêiner proposto por Roner (2003), que garante uma curva de resfriamento lenta, a saber de -0,18°C/min (37°C a 17°C); de -

0,0049°C/min. (17°C a 8°C) e de -0,0066°C/min. (8°C a 5,38°C), sendo a temperatura final de armazenamento do sêmen de 5°C. Possivelmente, este tenha sido um dos fatores mais importantes respondendo pela superioridade dos dados obtidos por Braga (2007) e Alkmin (2010).

Em um trabalho realizado por Siqueira (2011), dentro da mesma linha de pesquisa descrita anteriormente, diluiu-se as doses oriundas do ejaculado total em diluidor GGO (Foote, 2002), resfriando-as à 5°C, utilizando-se diferentes concentrações, sendo as fêmeas do grupo controle inseminadas com doses contendo 3×10^9 de espermatozoides/100mL, enquanto as dos outros grupos, contendo 6, 9 ou 12×10^9 de espermatozoides/dose pré-rediluição, foram inseminadas também com a mesma dose padrão, após a rediluição das doses hiperconcentradas, estocadas previamente à 5°C, em contêiner especial por 12 horas. Assim, a autora observou taxas de gestação e de parto de 100% para os tratamentos envolvendo as concentrações de 3 e 6 bilhões de espermatozoides. No entanto, para as doses contendo 9 e 12 bilhões de espermatozoides, pré-rediluição, as taxas de gestação e de parto foram de 76,92% e 75%, respectivamente.

Ao se comparar os dados obtidos por Siqueira (2011) com os do presente experimento, observou-se que apenas as doses contendo 6 bilhões pré-rediluição, obtiveram taxas de gestação e de parto iguais às do T1 do presente experimento. No entanto, as doses hiperconcentradas contendo 9 e 12 bilhões de espermatozoides, previamente à rediluição para doses padrão com 3×10^9 espermatozoides/dose, resultaram em um fertilidade inferior à obtida nos experimentos I e II (tabelas 18 e 25, respectivamente). Com relação aos dados de prolificidade, as fêmeas inseminadas com doses oriundas da rediluição de doses contendo 12×10^9 de espermatozoides em 100 mL, após 16 horas de armazenamento,

obtiveram uma média de leitões nascidos totais de $12,80 \pm 1,25$ e de nascidos vivos de $12,10 \pm 1,17$. No entanto, o número de nascidos totais para o T1 (24 bilhões/100mL), no presente experimento, foi de $14,00 \pm 1,09$ e de nascidos vivos de $13,20 \pm 0,90$, valores superiores aos observados por Siqueira (2011), e também aos dados de prolificidade obtidos por Braga (2007) e Alkmin (2010).

Reforça-se aqui a importância do tipo de coleta do sêmen, total ou fracionada, quanto à manutenção da fertilidade do sêmen resfriado, como discutido acima para os resultados superiores obtidos por Alkmin (2010) e também no presente experimento. Além do tipo de coleta, no presente experimento, utilizou-se doses inseminantes heterospérmicas, ou seja, advindas do ejaculado de mais de um macho, sendo nesta dissertação, oriundas da coleta de dois machos (tabela 13 – experimento I; tabela 20 – experimento II).

Experimentos utilizando inseminação artificial com sêmen heterospérmico têm demonstrado, frequentemente, que os espermatozoides de um macho são mais férteis quando comparados aos de outro macho, embora relativamente poucos machos, possam ser avaliados, em um mesmo experimento, devido à limitações práticas. Uma vantagem da inseminação artificial com sêmen heterospérmico é que as comparações entre ejaculados são feitas entre as fêmeas inseminadas, havendo exclusão do efeito do macho (Berger, 1995).

O número relativamente alto de espermatozoides utilizados na prática comercial da inseminação artificial (normalmente 3 bilhões de espermatozoides/dose inseminante), bem como a associação do sêmen de varrões apresentando fertilidades diferentes mascaram a reduzida fertilidade que poderia ser demonstrada para alguns machos, quando um baixo número de

espermatozoides/dose inseminante fosse utilizado para a inseminação artificial ou quando os machos fossem utilizados individualmente (Foxcroft *et al.*, 2010), utilizando doses homospérmicas.

De acordo com Foxcroft *et al.* (2010) o uso quase que universal do sêmen heterospérmico em granjas comerciais limita severamente a coleta de dados sobre a fertilidade relativa de machos. No entanto, os limitados dados disponíveis continuam a sugerir a presença de considerável variação na fertilidade dentro da população contemporânea de varrões.

Neste sentido, Foxcroft *et al.* (2010) avaliaram o desempenho reprodutivo de dois varrões com qualidade seminal comprovada (acima de 80% de espermatozoides móveis, com menos de 15% de espermatozoides com defeitos morfológicos). Os dois varrões tinham histórico de boa fertilidade, quando utilizados em experimentos que necessitavam de um número adequado de doses seminais heterospérmicas, visando-se normalizar qualquer “efeito do macho” na fertilidade de leitoas e porcas inseminadas com intuito de avaliar tratamentos experimentais. Antes de utilizarem estes machos para inseminações homospérmicas (apenas um macho/dose inseminante), os autores avaliaram o desempenho de cada um deles pelo uso de doses heterospérmicas ou homospérmicas, em protocolos de IA. Em todas as inseminações, foram utilizados 2 bilhões de espermatozoides/dose. Os dois varrões foram muito produtivos em inseminações homospérmicas e heterospérmicas. No entanto, observou-se uma diferença de 2,5 leitões no total de embriões, aos 30 dias de gestação, entre os varrões, devido a uma diferença de 10% na taxa de fertilização e/ou na sobrevivência embrionária. Assim, o desempenho acima do padrão de um dos machos foi mascarado pelo uso de doses heterospérmicas. Desta forma, a adoção de doses homospérmicas pode melhorar o número de leitões nascidos

totais, por permitir aos melhores machos a expressão do seu verdadeiro potencial, e além disso, possibilitar a identificação e o descarte de machos menos férteis devido à retirada do “efeito média”, que resulta do uso de doses heterospérmicas.

A distinção da fertilidade relativa de varrões, individualmente, bem como a utilização de inseminações homospérmicas, com apenas um macho, teria efeito econômico benéfico à indústria de suínos (Foxcroft *et al.*, 2010), assim como a identificação dos machos capazes de manter alta fertilidade com inseminações utilizando concentrações espermáticas menores nas inseminações.

Assim como o potencial dos machos superiores é subaproveitado quando se faz o uso de doses heterospérmicas, o desempenho dos machos inferiores e subférteis é mascarado, havendo melhora no seu desempenho reprodutivo. Os resultados aqui apresentados referentes à fertilidade e prolificidade das fêmeas inseminadas, superiores aos demais experimentos descritos, dentro da mesma linha de pesquisa, podem ser de certa forma, também explicados pelas inseminações heterospérmicas, quando os machos que responderam melhor ao resfriamento compensaram a utilização de alguns machos, possivelmente, menos resistentes. Outro importante fator a ser considerado é o rápido progresso genético da suinocultura, principalmente, no que diz respeito ao número de leitões nascidos vivos e totais, tornando difícil a comparação de dados referentes à experimentos realizados em épocas distintas.

Os dados referentes ao número de leitões natimortos e mumificados observados no experimento II, estão apresentados na tabela 26, não havendo diferenças ($p > 0,05$) entre os tratamentos, quanto às duas variáveis.

Para o E2T1-24B, o número de leitões natimortos foi de $0,60 \pm 0,34$ (4,28%),

inferior ao observado para o E1T1-15B, do experimento I ($1,11\pm 0,39$ ou 7,34%). Van der Lende (2000) considera como normais percentuais entre 5 a 15% de perdas fetais. No entanto, para Muirhead e Alexander (1997), o percentual aceitável de leitões natimortos deveria estar no intervalo de 3 a 5%. Desta forma, observou-se que para o E2T1-24B, a percentagem de natimortos está dentro do considerado normal e aceitável. Para o E2T2-3B, o número de natimortos foi de $0,63\pm 0,38$ (3,82%). De acordo com Dial *et al.* (1992) a percentagem de natimortos nunca deveria ultrapassar os 7%, embora Cutler *et al.* (1992) tenham descrito taxas de natimortalidade, variando entre 3 a 10%.

Braga (2007) observou $0,97\pm 1,02$ de leitões natimortos, enquanto Alkmin (2010) verificou um número de $0,90\pm 0,24$ leitões natimortos, quando da utilização da P1 do ejaculado, resfriada à 5°C. Nota-se que estes números foram superiores ao observado para o T1 do experimento II ($0,60\pm 0,34$); diferentemente do que observou-se para o T1 do experimento I, quando obteve-se um maior número de leitões natimortos ($1,11\pm 0,39$). No trabalho de Siqueira (2011) o número de leitões natimortos foi $0,38\pm 0,70$, sendo o menor dentre os três experimentos (Braga, 2007; Alkmin, 2010; Siqueira, 2011).

A presença de natimortos está associada a diferentes fatores, tais como doenças infecciosas, duração da gestação, ordem de parto, tamanho da leitegada, duração do parto, intervalo entre o nascimento de leitões, peso dos leitões, parto distócico, estresse térmico, intervenção manual obstétrica durante o parto, escore da condição corporal da porca ao parto, e deficiências nutricionais (Leenhouwers *et al.*, 1999; Tantasuparuk *et al.*, 2000; Lucia Jr. *et al.*, 2002; Schneider, 2002).

As taxas de mortalidade de leitões são variáveis, variando de 3,4% a 19,9%. Entretanto, Cavalcante (1987) relatou que

aproximadamente 5 a 8% dos leitões nascem mortos. Wentz *et al.* (2006) afirmaram que aproximadamente 10% dos leitões natimortos morrem pré parto, 15% após o parto e que 75% morrem durante o parto. Diante destes dados, pode-se concluir, então, que a ocorrência de leitões natimortos está associada à anoxia fetal, pelo rompimento do cordão umbilical, condição bastante comum em partos distócicos.

O número médio de fetos mumificados para o E2T1-24B foi de $0,20\pm 0,13$ (1,4%) e para o E2T2-3B de $1,00\pm 0,50$ (6%). Observou-se, aqui, um percentual bem inferior para o E2T1-24B em relação ao E1T1-15B ($1,56\pm 1,31$ ou 10,32%), que teve a sua média bastante elevada por uma fêmea que pariu 12 fetos mumificados.

Em um trabalho realizado por Braga (2007), observou-se $0,04\pm 0,19$ fetos mumificados, valor muito inferior aos observados, no presente experimento, independentemente do tratamento.

No entanto, Alkmin (2010) obteve um valor de $0,30\pm 0,30$ fetos mumificados para as porcas inseminadas com sêmen oriundo da P1 resfriado à 5°C, após a sua diluição em diluidor GGO (Foote, 2002). Este número é similar ao observado para o T1 do presente experimento, embora ainda muito inferior ao valor obtido para as porcas do grupo controle (T2), de $1,00\pm 0,50$ (6%).

A presença de fetos mumificados está associada à doenças infecciosas, ordem de parto, tamanho da leitegada, capacidade uterina, temperatura ambiental e intoxicação por micotoxinas (Dial *et al.*, 1992; Schneider *et al.*, 2003). A mumificação é caracterizada pela morte fetal após os 35 dias de gestação, quando já houve calcificação do esqueleto fetal, havendo então reabsorção dos líquidos dos tecidos moles, mas não do tecido ósseo (Sims e Glastonbury, 1996).

Considera-se normal uma prevalência de 0,5% de fetos mumificados, sendo o valor máximo aceitável de 1,5%. Deste modo, o percentual de fetos mumificados no T2 está muito acima do limite máximo aceitável, assim como aqueles dos T1 e T2 do experimento I. No entanto, Borges *et al.* (2003) registraram uma variação de 3,6% a 5,6% de mumificados em quatro granjas brasileiras.

A crescente preocupação com o percentual de fetos mumificados se deve a sua possível associação à maior prolificidade das fêmeas nos dias atuais, podendo também estar associada à maior precisão dos dados coletados nas granjas (Borges *et al.*, 2008).

O maior percentual de fetos mumificados nos experimentos I e II pode estar relacionado a ordem de parto das fêmeas inseminadas, em virtude de todas serem primíparas. Schneider *et al.* (2003) afirmaram que sob condições endêmicas, especialmente as primíparas, podem apresentar taxas de mumificação superiores às observadas nas fêmeas de ordem de parto mais avançadas. Isto se deve à condição imunológica das fêmeas mais jovens, as quais ainda não foram expostas por tempo suficiente aos patógenos endêmicos presentes no plantel. Além disso, como o desenvolvimento uterino está relacionado à alternância do estrógeno e da progesterona à cada ciclo reprodutivo, em porcas mais velhas o número de ciclos é superior, o que implica em maior desenvolvimento e melhor capacidade uterina do que em porcas mais jovens.

Além disso, Privado Filho e Toniolo (2011) observaram que a média anual de mumificados foi superior nas fêmeas primíparas.

No que se refere à fertilidade e prolificidade das fêmeas inseminadas nos dois experimentos, observa-se que estes parâmetros não foram afetados pelo aumento da hiperconcentração espermática nas doses pré-rediluição (15 para 24

bilhões/dose de 100mL). Há que se salientar, entretanto, que a utilização de doses de sêmen heterospérmicas pode ter favorecido os resultados de fertilidade e prolificidade aqui observados, em detrimento dos demais experimentos que utilizaram o sêmen homospérmico, resfriado à 5°C e diluído em diluidor GGO (Foote, 2002), como discutido por Foxcroft *et al.* (2010).

Ao trabalhar dentro da mesma linha de pesquisa, Siqueira (2011) também observou a manutenção da fertilidade e da prolificidade das fêmeas, quando aumentou a concentração por dose de 100 mL de 6 ou 9 bilhões para 12 bilhões de espermatozoides móveis.

O protocolo de coleta, diluição, envase e resfriamento do sêmen deve ser simples, mas econômico, principalmente porque os custos associados ao armazenamento e transporte de grande número de doses de sêmen pode tornar seu uso desaconselhável. Assim, Bratton *et al.*, (1955), Desjardins e Hafs (1962) e Macmillan *et al.* (1978) propuseram o armazenamento e transporte de doses hiperconcentradas, oriundas do sêmen de touros, para rediluição no momento da inseminação, visando otimizar o sistema de transporte e diminuir os custos associados ao armazenamento e/ou transporte de doses de sêmen.

Vários são os trabalhos disponíveis na literatura que compararam a maior resistência dos espermatozoides oriundos da primeira porção (P1; primeiros 10-15 mL), da fração rica do ejaculado, à manipulação laboratorial (Sélles *et al.*, 2001; Peña *et al.*, 2003; Peña *et al.*, 2004a). No mesmo sentido, Saravia (2008) utilizou a coleta fracionada do sêmen de varrões e estabeleceu que os espermatozoides contidos nos primeiros 10-15mL da fração rica do ejaculado, correspondem à aproximadamente 80% dos espermatozoides do ejaculado total. Baseando-se nos estudos envolvendo a sua

maior resistência à manipulação, congelou o sêmen suíno hiperconcentrado (2×10^9 espermatozoides/mL) em MiniFlatPacks[®] (0,5-0,7mL) e, não observou nenhuma diferença quanto à motilidade e vigor, entre as doses congeladas hiperconcentradas e as do grupo controle (FlatPacks[®], 5mL).

Em seguida, Alkmin (2010) avaliou a manutenção da viabilidade dos espermatozoides oriundos da P1 (primeiros 15 mL) submetidos à diluição em diluidor GGO (Foote, 2002) e resfriados à 5°C, durante o armazenamento em contêiner especial, proposto para o sêmen suíno, por Roner *et al.* (2006). Neste estudo, avaliou também a manutenção da capacidade fecundante do sêmen submetido a este protocolo de resfriamento, utilizando a inseminação de fêmeas e coleta dos dados referentes à sua fertilidade e prolificidade. No entanto, uma das limitações deste contêiner é a capacidade de transportar apenas 12 doses de 100 mL, número muito pequeno, principalmente, quando se considera que uma única fêmea pode receber até 3 inseminações por ciclo. Esta restrição eleva muito os custos de transporte/armazenamento de doses pela necessidade de se transportar/armazenar vários contêineres, o que torna a sua utilização pouco factível.

Vale enfatizar que Siqueira (2011) utilizando-se da proposta da hiperconcentração do sêmen de touros por pesquisadores da Nova Zelândia, propôs a sua adequação ao sêmen suíno, de forma a otimizar o número de doses transportadas no contêiner proposto por Roner *et al.* (2006). Assim, utilizou o sêmen oriundo do ejaculado total de varrões, com doses variando de 3 a 12×10^9 espermatozoides/dose de 100 mL, e avaliou a fertilidade das fêmeas inseminadas com os diferentes tratamentos. Os resultados descritos pela autora, incluindo a manutenção das características espermáticas bem como da fertilidade e prolificidade das fêmeas inseminadas com

as doses oriundas do sêmen mantido hiperconcentrado (6, 9 e 12 bilhões) e rediluído, antes das inseminações, para doses inseminantes de 3×10^9 espermatozoides/dose, comprovaram a eficiência das doses hiperconcentradas, que possibilitaram a multiplicação por quatro vezes da capacidade original do contêiner (48 doses/contêiner).

Ao trabalhar na mesma linha de pesquisa, Alkmin (2010) estudou a possibilidade de utilização da P1 do sêmen de varrões (primeiros 15 mL) para o processamento e transporte do sêmen diluído e resfriado, sendo o restante do ejaculado utilizado na rotina da granja sem prejuízos à fertilidade do plantel, de modo a diminuir a “distância” genética entre a granja núcleo e as multiplicadoras, que poderiam utilizar os mesmos machos nas inseminações. Diante dos trabalhos apresentados pela literatura, à respeito da maior resistência à diluição, resfriamento e até mesmo ao congelamento dos espermatozoides da P1 (primeiros 10-15 mL), esta fração seria, preferencialmente, a mais indicada para ser transportada hiperconcentrada após a diluição e resfriamento à 5°C, até as granjas alvo, quando seriam rediluídas para doses padrão de 3×10^9 de espermatozoides, previamente à inseminação das fêmeas, podendo ainda serem mantidas armazenadas por determinado período de tempo.

Sabe-se também que diante das enormes conquistas envolvendo a inseminação artificial em bovinos, esta tecnologia em suínos continua em sua infância, sendo o sêmen produzido em muitas centrais de pequeno porte, carentes de muitos equipamentos e, principalmente, de mão de obra qualificada. Desta forma, a qualidade do sêmen produzido tem grande variação, o que irá influenciar diretamente na sua qualidade, durante e após o transporte (Landsverk, 2000).

Apesar da grande resistência à utilização de diluidores não comerciais, os responsáveis pelas centrais de inseminação de suínos devem considerar que nas centrais de touros, de todo o mundo, que manipulam milhares de doses/dia, o diluidor utilizado para o congelamento das doses contém gema de ovo, o que torna necessária, a sua preparação diária, para a produção dos diluidores. Deve-se ter em mente que uma das conclusões retiradas dos diferentes trabalhos, mas principalmente do trabalho de Alkmin (2010) é que as doses inseminantes, diluídas no diluidor GGO (Foote, 2002), apresentaram as melhores características de motilidade e vigor espermáticos, quando comparadas às diluídas no diluidor comercial MR-A[®]. Sabe-se que um dos maiores obstáculos encontrados para o transporte das doses de sêmen de varrões, refere-se às dificuldades inerentes à manutenção da motilidade e fertilidade do sêmen após a diluição e o armazenamento (Polge, 1956b), por períodos prolongados de tempo. Além disso, há que se enfatizar que trabalhos muito antigos, como os de Roy (1955), Polge (1956b), DuMesnil du Buisson (1956), DuMesnil du Buisson e Dauzier (1956) têm afirmado serem os diluidores que contém glicose ou glicina, associados à gema de ovo ou leite na sua composição, os que melhor preservam a motilidade do sêmen do varrão.

Em um trabalho realizado por Okere (2001) no Canadá, colocou-se a distância, como o maior obstáculo para o uso disseminado da inseminação artificial, em virtude da grande extensão territorial do país. Pode-se afirmar, que também no Brasil, este tem sido um grande obstáculo, além da dificuldade de manutenção da viabilidade espermática, durante o transporte, visando a utilização de doses oriundas das centrais. Assim, o seu uso se restringiu à uma utilização local, no máximo regional, levando varrões de inestimável valor genético, principalmente aqueles que

fecundam as fêmeas de rebanhos núcleo, a serem enormemente subutilizados. Com certeza, a otimização do seu uso para longas distâncias poderia reduzir, em muito, as distâncias genéticas observadas entre os rebanhos núcleos e os multiplicadores.

Landsverk (2000) afirma que a grande expansão do uso da inseminação artificial em suínos tem apresentando uma tendência de estabelecimento de grandes centrais de inseminação, embora menos numerosas. Segundo o mesmo autor, centrais de alta qualidade e eficientes tendem a ser maiores.

Assim, questões têm sido levantadas sobre o tipo de envase e a forma de distribuição do sêmen, havendo aumento crescente da necessidade de se transportar o sêmen oriundo de um sistema de produção de doses mais centralizado. As condições de transporte do sêmen têm grande impacto na fertilidade das porcas inseminadas. Desta forma, existem importantes fatores a serem considerados, tais como a qualidade do sêmen produzido, a acessibilidade ao sêmen e a temperatura na qual as doses serão transportadas (Landsverk, 2000).

Neste sentido, de forma a tornar a proposta da hiperconcentração e do transporte do sêmen factível de ser utilizado na rotina das granjas núcleo e/ou granjas comerciais, propõe-se: 1) coletar os primeiros 15 mL do sêmen (P1), a serem diluídos em diluidor GGO e resfriados à 5°C, em contêiner especial, com curva de resfriamento lenta para o transporte do sêmen.; 2) O número de doses inseminantes a serem transportadas por dose hiperconcentrada poderia ser de 5 (15×10^9 de espermatozoides móveis em 100 mL de diluidor) à 8 (24×10^9 de espermatozoides em 100 mL de diluidor); 3) as doses hiperconcentradas seriam rediluídas para doses padrão de 3×10^9 de espermatozoides móveis/100 mL após 12 -18 horas de estocagem, antes de serem utilizadas para as inseminações das fêmeas; 4) As doses rediluídas poderiam, ainda, ser armazenadas

por até 24 horas após a rediluição; 5) Desta forma, o contêiner poderia transportar de 60 a 96 doses inseminantes por vez, de forma a possibilitar a redução do número de contêiners a serem transportados e, assim, dos custos do transporte; 6) Finalmente, o restante do ejaculado poderia ser coletado e utilizado no próprio local de coleta do sêmen, como proposto por Alkmin (2010).

Para que seja possível o aprimoramento das técnicas de coleta e processamento do sêmen a ser manipulado, como proposto acima, torna-se necessário o treinamento da mão de obra utilizada nas centrais de inseminação de suínos. Além disso, requer o investimento em alguns equipamentos para uso no laboratório, sem os quais pode haver prejuízo à qualidade das doses e comprometimento da tecnologia. No entanto, o investimento em tecnologia é um passo comum a todos os sistemas em evolução. De acordo com Landsverk (2000), a tendência é que as centrais de inseminação na suinocultura, acompanhem o que já se fez, há muito, na bovinocultura, quando se tornaram maiores e menos numerosas, envolvendo a distribuição de um grande número de doses, a custos cada vez mais reduzidos.

5. CONCLUSÕES

- A coleta fracionada do sêmen é simples e permite o processamento dos primeiros 15 mL (P1) do sêmen para o transporte, em contêiner especial, após a sua diluição no diluidor GGO;
- O sêmen oriundo da P1 pode ser diluído em diluidor GGO e resfriado à 5°C, mantendo inicialmente uma hiperconcentração de 15 bilhões de espermatozoides móveis/100 mL, acompanhada por uma

rediluição após 12 horas de armazenamento à 5°C, e, ainda manter a viabilidade espermática por até 24 horas de armazenamento;

- A utilização de doses inseminantes contendo 3 bilhões de espermatozoides móveis/100 mL, oriundas da rediluição de doses hiperconcentradas contendo 15 bilhões de espermatozoides móveis foi capaz de responder por taxas de gestação, de parto e quanto às características das leitegadas aceitáveis comercialmente;
- Não houve prejuízo à manutenção da viabilidade espermática quando o número de espermatozoides por dose hiperconcentrada de 100 mL passou de 15 para 24 bilhões de espermatozoides móveis;
- O sêmen oriundo da P1 pode ser diluído em diluidor GGO e resfriado à 5°C, mantendo, inicialmente uma hiperconcentração de 24 bilhões de espermatozoides móveis/100 mL, acompanhada por uma rediluição após 12 horas de armazenamento à 5°C, e ainda manter a viabilidade espermática por até 24 horas de armazenamento;
- A utilização de doses inseminantes contendo 3 bilhões de espermatozoides móveis/100 mL, oriundas da rediluição de doses hiperconcentradas contendo 24 bilhões de espermatozoides móveis foi capaz de responder por taxas de gestação e de parto, e também por características de leitegada aceitáveis comercialmente;
- O restante do sêmen, coletado após os primeiros 15 mL da fração rica

pode ser utilizado normalmente para a inseminação rotineira da granja.

6. PROPOSTAS PARA O FUTURO

- Utilizar o sêmen homospérmico hiperconcentrado e rediluído para avaliar a sua eficiência, quando da inseminação de fêmeas suínas;
- Utilizar um maior número de fêmeas por tratamento, incluindo diferentes ordens de parto para as inseminações com os tratamentos experimentais;
- Realizar as inseminações artificiais com o sêmen rediluído oriundo das doses hiperconcentradas, armazenadas por um maior período de tempo;
- Realizar as inseminações artificiais com o sêmen rediluído, submetido a um maior período de armazenamento do que o utilizado neste experimento;
- Determinar qual o número máximo de espermatozoides móveis pode ser utilizado em doses hiperconcentradas diluídas no diluidor GGO ou em outros diluidores comerciais;
- Utilizar pipetas de inseminação intra-uterina e intra-uterina profunda para as inseminações artificiais visando-se a redução do volume inseminante e assim a concentração espermática por dose, de forma a otimizar o número de doses produzidas por ejaculado;
- Realizar a rediluição para concentrações inferiores a 3 bilhões de espermatozoides/100 mL e utilizar pipetas de inseminação intra-uterina e intra-uterina profunda para inseminar fêmeas e avaliar a fertilidade;
- Associar o protocolo de coleta, hiperconcentração, rediluição e inseminação a protocolos de indução de cio e de ovulação para as inseminações, com pipetas tradicionais e intra-uterinas.

7. REFERÊNCIAS

- AALBERS, J.C.; MANN, T.; POLGE, C. Metabolism of boar semen in relation to sperm motility and survival. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.2, n.1, p.42-53, 1961.
- AAMDAL, J.; HOGSET, I.; FILSETH, O. Extirpation of the preputial diverticulum of boars used in artificial insemination. *Journal of American Veterinary Medicine Association*, v.132, n.12, p.322, 1958.
- ABAD, M.; GARCIA, J.C.; SPRECHER, D.J. *et al.* Effect of insemination-ovulation interval and addition of seminal plasma on sow fertility to insemination of cryopreserved semen. *Reproduction in Domestic Animals*, v.42, n.4, p.418-422, 2007.
- ABAIGAR, T.; HOLT, W.V.; HARRISSON, R.A.P. *et al.* Sperm subpopulation in boar (*Sus scrofa*) and gazelle (*Gazela and mhorr*) semen as revealed by pattern analysis of computer assisted motility assessments. *Biology of Reproduction*, v.60, n.1, p.32-41, 1999.
- AHERNE, F.X.; CHRISTOPHERSON, R.J.; THOMPSON, J.R. *et al.* Factors affecting the onset of puberty, post weaning estrus and blood hormone levels of Lacombe gilts. *Canadian Journal of Animal Science*, v.56, n.4, p.681-692, 1976.
- AITKEN, R.J. ; CLARKSON, J.S. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.81, n.2, p.459-469, 1987.
- ALEXOPOULOS, C.; BOSCO, C.; SARATSI, 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. *Animal Science*, v.62, n.3, p.599-604, 1996.
- ALKMIN, V.D. *Efeito da fração do ejaculado e do método de conservação sobre as características físicas do sêmen suíno e a fertilidade de fêmeas*. 2010. 226f. Tese (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- ALM, K.; PELTONIEMI, O.; KOSKINEN, E. *et al.* Porcine field fertility with two different insemination doses and the effect of sperm morphology. *Reproduction Domestic Animal.*, v.41, n.3, p.210-213, 2006.
- ALMOND, G.; BRITT, J.H.; CARR, J. *et al.* *The swine AI Book: a field and laboratory technician's guide to artificial insemination in swine*. 2.ed. Raleigh, NC: Minitube of America, 1994. 108p.
- ALMOND, G.; BRITT, J.H.; FLOWERS, B. *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.C. Cytoplasmic droplets on boar sperm cells. *Swine Health and Production*. 1998. p.128. Disponível em: <<http://www.aasv.org/shap/issues/v6n3/v6n3p128.pdf>>. Acesso em: 10 de Outubro de 2010.
- ALTHOUSE, G.C. Sanitary procedures for the production of extended semen. *Reproduction in Domestic Animals*, v.43, n.3, p.374-378, 2008.
- 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, n.5, p.1167-1176, 2000.
- ALTHOUSE, G.C.; LU, K.G. Bacteriospermia in extended porcine semen. *Theriogenology*, v. 63, n.2, p.573-584, 2005.

- ALTHOUSE, G.C.; WILSON, M.E.; KUSTER, C. *et al.* Characterization of lower temperature storage limitations of fresh-extended porcine semen. *Theriogenology*, v.50, n.4, p.535-543, 1998.
- ALVAREZ, J.G.; STOREY, B.T. Lipid peroxidation and the reactions of superoxide and hydrogen peroxide in mouse spermatozoa. *Biology of Reproduction*, v.30, n.4, p.833-841, 1984.
- ALVAREZ, J.G.; STOREY, B.T. Spontaneous lipid peroxidation in rabbit epididymal spermatozoa: its effect on sperm motility. *Biology of Reproduction*, v.27, n.5, p.1102-1108, 1982.
- AMARAL FILHA, W.S.; BERNARDI, M.L.; WENTZ, I. *et al.* Reproductive performance of gilts according to growth rate and backfat thickness at mating. *Animal Reproduction Science*, v.121, n.1-2, p.139-144, 2010.
- AMBROSE, J.D.; KASTELIC, J.P.; RAJAMAHENDRAN, R. *et al.* Progesterone (CIDR) based fixed timed AI protocols using GnRH, responses and pregnancy rates. *Theriogenology*, v.64, n.7, p.1457-1474, 2005.
- 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, n.5, p.895-907, 2004.
- ANTON, M.; GANDEMER, G. Composition, solubility and emulsifying properties of granules and plasma of egg yolk. *Journal of Food Science*, v.62, n.3, p.484-487, 1997.
- ANTON, M.; MARTINET, V.; DALGALARRONDO, M. *et al.* Chemical and structural characterization of low density lipoproteins purified from hen egg yolk. *Food Chemistry*, v.83, n.2, p.175-183, 2003.
- ARMSTRONG, J.D.; KRAELING, R.R.; BRITT, J.H. Effects of naloxone on transient weaning on secretion of LH and prolactin in lactating sows. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.83, n.1, p.301-308, 1988.
- ASH, R.W.; HEAP, R.B. Oestrogen, progesterone and corticosteroid concentrations in peripheral plasma of sows during pregnancy, parturition, lactation and after weaning. *Journal of Endocrinology*, v.64, n.1, p.141-154, 1975.
- 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. *Reproduction, Fertility and Development*, v.6, n.2, p.173-180, 1994.
- ASSREUY, A.M.S.; CALVETE, J.J.; ALENCAR, N.M.N. *et al.* Spermadhesin PSP-I/PSP-II heterodimer and its isolated subunits induced neutrophil migration into the peritoneal cavity of rats. *Biology of Reproduction*, v.67, n.6, p.1796-1803, 2002.
- 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. *Biology of Reproduction*, v.68, n.5, p.1836-1841, 2003.
- AUMAITRE, A.; DAGORN, J.; LEGAULT, C. *et al.* Influence of farm management and breed type on sows conception weaning interval and productivity in France. *Livestock Production Science*, v.3, n.1, p.75-83, 1976.
- AUMÜLLER, R.; WILLEKE, H. Computer controlled analysis of boar semen with the "Cellsoft" system. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 11., 1988.

Proceedings... Dublin, Ireland: University College Dublin, 1988. p.227.

AUROUX, M.R.; JACQUES, L.; MATHIEU, D. Is the sperm bacterial ratio a determining factor in impairment of sperm motility: a in-vitro study in men with *Escherichia coli*. *International Journal of Andrology*, v.14, n.4, p.264-270, 1991.

BAKER, L.N.; WOEHLING, H.L.; CASIDA, L.E. *et al.* Occurrence of estrus in sows following parturition. *Journal of Animal Science*, v.12, n.1, p.33-38, 1953.

BAKER, R.D.; DZITRK, P.J.; NORTON, H.W. *et al.* Effect of volume of semen, number of sperm and drugs on transport of sperm in artificially inseminated gilts. *Journal of Animal Science*, v.27, p.88-93, 1968.

BAMBA K.; CRAN, D.G. Effects of treatment with butylated hydroxytoluene on the susceptibility of boar spermatozoa to cold stress and dilution. *Journal of Reproduction Fertility*, v.95, n.1, p.69-77, 1992.

BARB, C.R.; KRAELING, R.R.; RAMPACEK, G.B. *et al.* Opioid inhibition of luteinizing hormone secretion in the postpartum lactation sow. *Biology of Reproduction*, v.35, n.2, p.368-371, 1986.

BARTH, A.D. The relationship between sperm abnormalities and fertility. In: TECHNICAL CONFERENCE ON ARTIFICIAL INSEMINATION AND REPRODUCTION, 14., 1992, Columbia. *Proceedings...* Columbia: National Association of Animal Breeders, 1992. p.47-63.

BARTH, A.D.; OKO, R.J. *Abnormal morphology of bovine spermatozoa*. Ames, IA: Iowa State University Press, 1989. 285p.

BASURTO-KUBA, V.M.; EVANS, L.E. Comparison of sperm-rich fractions of boar semen collected by electroejaculation and the gloved hand technique. *Journal of the*

American Veterinary Medical Association, v.78, n.9, p.985-986, 1981.

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. *Animal Reproduction Science*, v.103, n.3-4, p.323-335, 2008.

BEDFORD, J.M. *Maturation, transport and fate of spermatozoa in the epididymis*. Washington: DW Hamilton & RO Greep, 1975, 317p.

BEDFORD, J.M.; CALVIN, H.I. The occurrence and possible functional significance of -S-S- crosslinks in sperm heads, with particular reference to eutherian mammals. *Journal of Experimental Zoology*, v.188, p.137-156, 1974

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. *Reproduction in Domestic Animals*, v.40, n.6, p.507-510, 2005.

BENSON, R.W., PICKETT, B.W., KOMAREK, R.J. *et al.* Effect of incubation and cold shock on motility of boar spermatozoa and their relationship to lipid content. *Journal of Animal Science*, v.26, n.5, p.1078-1081, 1967.

BERGER, T. Proportion of males with lower fertility spermatozoa estimated from heterospermic insemination. *Theriogenology*, v.43, n.4, p.769-775, 1995.

BERGERON, A.; CRÊTE, M.H.; BRINDLE, Y. *et al.* Low density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. *Biology of Reproduction*, v.70, n.3, p.708-717, 2004.

BERGERON, A.; MANJUNATH, P. New insights towards understanding the

- mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Molecular Reproduction and Development*, v.73, n.10, p.1338-1344, 2006.
- BEVERS, M.M.; WILLEMSE, A.H.; KRUIP, T. *et al.* Prolactin levels and the LH-response to synthetic LH-RH in the lactation sow. *Animal Reproduction Science*, v.4, n.2, p.155-163, 1981.
- BJORND AHL, L.; KVIST, U. Influence of seminal vesicular fluid on the zinc content of human sperm chromatin. *International Journal of Andrology*, v.13, n.3, p.232-237, 1990.
- BJÖRND AHL, L.; KVIST, U. Human sperm chromatin stabilization: a proposed model including zinc bridges. *Molecular Human Reproduction*, v.16, n.1, p.23-29, 2010.
- BLACKSHAW, A.W. ; SALISBURY, C.W. Factors influencing metabolic activity of bull spermatozoa II. Cold Shock and its prevention. *Journal of Dairy Science*, v.40, n.9, p.1099, 1957.
- BLACKSHAW, A.W. The motility of ram and bull spermatozoa in dilute suspension. *The Journal of General Physiology*, v.36, n.4, p.449-462, 1953.
- BLACKSHAW, A.W. The prevention of temperature shock of bull and ram semen. *Australian Journal of Biology and Science*, v.7, n.4, p.573, 1954.
- BLOOM, 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). *Nordisk Veterinaermedicin*, v.35, n.3, p.105-130, 1983.
- BONET, S.; BRIZ, M.; PINART, E. Light microscopy characterization of sperm morphology. *Microscopy and Analysis*, v.9, p.29-31, 1995.
- 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. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.60, n.5, p.1234-1240, 2008.
- 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: ABRAVES*, 2003. p.195-196.
- BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I. Inseminação artificial em suínos no Brasil. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.21, n.3, p.13-15, 1997
- BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I.; BENNEMANN, P.E. *et al.* Processamento e armazenamento das doses inseminantes. In: INSEMINAÇÃO artificial na suinocultura tecnificada. Porto Alegre: Palloti, 2005a. 185p.
- BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I.; DALLANORA, D. Situação atual da inseminação artificial em suínos. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.33, n.1, p.17-32, 2005b.
- BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I.; FERREIRA, F.M. *et al.* Exame do ejaculado. In: BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I. (Eds). *Suinocultura em ação: inseminação arficial na suinocultura tecnificada*. Porto Alegre: Pallotti, 2005c. Volume 2, p.69-90.
- BORTON, A.; JAWORSKI, A.; NELLO, J.E. Factors influencing the fertility of naturally and artificially mated swine. Michigan: Michigan State University, 1965. p.1-81. (Research Bulletin, 8).
- BOURSNELL, J.C.; BARONOS, S.; BRIGGS, P.A. *et al.* The concentrations of zinc in boar seminal plasma and vesicular secretion in relation to those of nitrogenous substances, citrate, galactose and fructose.

- Journal of Reproduction and Fertility*, v.29, n.2, p.215-227, 1972.
- BOWER, R. E. JR.; CRABO, B. G.; GRAHAM E. F. Factors affecting myometrial activity in pigs. *Journal of Animal Science*, v.39, n.1, p.200, 1974.
- 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, n.4, p.669-676, 2003.
- BRAGA, C.S.R. *Fertilidade de fêmeas suínas inseminadas com sêmen diluído e resfriado a 5°C ou 17°C*. 2007. 173f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- 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, 14., 2009, Uberlândia. *Anais...* Belo Horizonte: ABRAVES, 2009.
- BRATTON, R.W.; FOOTE, R.H.; CRUTHERS, J.C. Preliminary fertility results with frozen bovine spermatozoa. *Journal of Dairy Science*, v.38, n.1, p.40-46, 1955.
- BREDDERMAN, P.J.; FOOTE, R.H. Factors stabilizing bull sperm cell volume and prolonging motility at high dilution. *Experimental Cell Research*, v.66, n.2, p.458-464, 1971.
- BRITT, J. H. Improving sow productivity through management during gestation, lactation and after weaning. *Journal of Animal Science*, v.63, n.4, p.1288-1296, 1986.
- BRITT, J.H.; ARMSTRONG, J.D.; COX, N.M. *et al.* Control of follicular development during and after lactation in sows. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, v.33, p.37-54, 1985.
- BRUSSÖW, K.P.; SCHNEIDER, F.; KANITZ, W. *et al.* Studies on fixed time ovulation induction in the pig. *Society of Reproduction and Fertility Supplement*, v.66, p.187-195, 2009.
- BUHR, M.M.; CURTIS, E.F.; KAKUDA, N. Effect of boar sperm cryopreservation on the composition and behavior of head membrane lipids. *Cryobiology*, v.31, n.3, p.224-235, 1994.
- CABALLERO, I.; VAZQUEZ, J.M.; CENTURIÓN, F. *et al.* Comparative effects of autologous and homologous seminal plasma on the viability of largely extended boar spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, v.39, n.5, p.370-375, 2004.
- CALVETE, J.J.; ENSSLIN, M.; MBURU, J. *et al.* Monoclonal antibodies against boar sperm zona pellucida-binding protein awn-1. characterization of a continuous antigenic determinant and immunolocalization of awn epitopes in inseminated sows. *Biology of Reproduction*, v.57, n.4, p.735-742, 1997.
- CALVETE, J.J.; MANN, K.; SCHAFER, W. *et al.* Boar spermadhesin PSP-II: localization of postranlational modifications, heterodimer formation with PSP-I glycoforms and effect of dimerization on the ligand-binding capabilities of the subunits. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, v.365, p.179-182, 1995.
- CALVIN, J.; TUBBS, P.K. Mitochondrial transport processes and oxidation of NADH by hypotonically -treated boar spermatozoa. *European Journal of Biochemistry*, v.89, n.1, p.315-320, 1978.
- CAMERON, R.D.A. Measurement of semen production rates of boars. *Australian Veterinary Journal*, v.62, n.9, p.301-304, 1985.

- CAMERON, R.D.A. Porcine reproduction now and in the future. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY, 15., 1998, Birmingham. *Proceedings...* Birmingham: IPVS, 1998. p.209.
- CAMERON, R.D.A.; BLACKSHAW, A.W. The effect of elevated ambient temperature on spermatogenesis on the boar. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.59, n.1, p.173-179, 1980.
- CAMPANERO-RHODES, M.A.; MENÉNDEZ, M.; SÁIZ, J.L. *et al.* Zinc ions induce the unfolding and self-association of boar spermadhesin PSP-I, a protein with a single cub domain architecture, and promote its binding to heparin. *Biochemistry*, v.45, n.27, p.8227-8235, 2006.
- CANDINI, P.H.; MORETTE, A.S.; SILVEIRA, P.R.S. *et al.* Utilization of a protocol of synchronization of ovulation induced by porcine LH to perform insemination programs in fixed time with one or two inseminations per sow. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON PIG REPRODUCTION, 6., 2001, Missouri. *Proceedings...* Missouri: University of Missouri, 2001. p.99.
- CASSAR, G. Hormonal control of pig reproduction. *London Swine Conference – Tools and the Trade*, v.1, n.1-2, p.137-139, 2009.
- CASSAR, G.; KIRKIWOOD, R.N.; POLJAK, Z. *et al.* Effect of single or Double insemination on fertility of sows bred at on induced oestrus and ovulation. *Journal of Swine Health and Production*, v.13, n.5, p. 254-258, 2005.
- CASSAR, G.; KIRKWOOD, R.N.; POLJAK, Z. *et al.* Effect of estrogen formulation and site of deposition on fertility of artificially inseminated sows treated with hCG to induce ovulation. *Journal of Swine Health and Production*, v.12, n.6, p.285-287, 2004.
- CASTAGNA, C.D. *Considerações sobre programas de inseminação artificial em suinocultura*. 2002, 145f. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.
- 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. *Reproduction in Domestic Animals*, v.32, n.5, p.251-258, 1997.
- CAVALCANTI, S.S. *Produção de suínos*. 2. ed. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1987. p.111-155.
- CENTURIÓN, F.; VÁZQUEZ, J.M.; CALVETE, J.J. *et al.* Influence of porcine spermadhesins on the susceptibility of boar spermatozoa to high dilution. *Biology of Reproduction*, v.69, n.2, p.640-646, 2003.
- CEROVSKY, J. The influence of the dilution degree of boar sperm on the spermatozoa survival rate. *Zivocisna Cyroba*, v.27, p.619-626, 1982.
- CHEMES, E.H.; RAWE, Y.V. Sperm pathology: a step beyond descriptive morphology. Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men. *Human Reproduction*, v.9, n.5, p.405-428, 2003.
- CHENG, P.; CASIDA, L.E.; BARRET, G.R. Effects of dilution on motility of bull spermatozoa and the relation between motility in high dilution and fertility. *Journal of Animal Science*, v.8; n.1, p.81-88, 1949.
- 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. *Journal of Andrology*, v.23, n.3, p.384-392, 2002.
- CHRISTOVA, Y.; JAMES, P.S.; JONES, R. Lipid diffusion in sperm plasma membranes exposed to peroxidative injury

- from oxygen free radicals. *Molecular Reproduction and Development*, v.68, n.3, p.365-372, 2004.
- CLAUS, R., HOANG-VU, C., ELLENDORFF, F. *et al.* Seminal oestrogens in the boar: origin and function in the sow. *Journal of Steroid Biochemistry*, v.26, n.1-3, p.1-5, 1987.
- CLOWES, E.J., AHERNE, F.X. ; FOXCROFT, G.R. Effect of delayed breeding on endocrinology and fecundity of sows. *Journal of Animal Science*, v.72, n.2, p.283-291, 1994.
- COLE, D.J.A. Nutrition strategies to optimize reproduction in pigs. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, v.40, p.67-82, 1990.
- COLENBRANDER, B.; FEITSMA, H.; GROOTEN, H.J. Optimizing semen production for artificial insemination in swine. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, v.48, p.207-15, 1993.
- COLLIER, R.J.; MCNAMARA, J.P.; WALLACE, C.R. *et al.* A review of endocrine regulation of metabolism during lactation. *Journal of Animal Science*, v.59, n.2, p.498-510, 1984.
- COOKSON, A.D.; THOMAS, A.N.; FOULKES, J.A. Immunochemical investigation of the interaction of egg yolk lipoproteins with bovine spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.70, n.2, p.599-604, 1984.
- 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. *Microscopy Research and Technique*, v.61, n.1, p.28-38, 2003.
- COSGROVE, J.R. ; FOXCROFT, G.R. Nutrition and reproduction in the pig: ovarian aetiology. *Animal Reproduction Science*, v.42, n.1-4, p.131-141, 1996.
- COURTENS, J.L.; PLÖEN, L.; LOIR, M. Immunocytochemical localization of protamine in the boar testis. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.82, n.2, p.635-643, 1988.
- COX, N.M.; BRITT, J.H. Pulsatile administration of GnRH to lactating sows: endocrine changes associated with induction of fertile estrus. *Biology of Reproduction*, v.27, n.5, p.1126-1130, 1982b.
- COX, N.M.; BRITT, J.H. Relationships between endogenous gonadotropin-releasing hormone, gonadotropins, and follicular development after weaning in sows. *Biology of Reproduction*, v.27, n.1, p.70-78, 1982a.
- COX, N.M.; BRITT, J.H.; ARMSTRONG, W.D. *et al.* Effect of feeding fat and altering weaning schedule on rebreeding in primiparous sows. *Journal of Animal Science*, v.56, n.1, p.21-29, 1983.
- CREMADES, T.; ROCA, J.; RODRIGUEZ-MARTÍNEZ, H. *et al.* Kinematic changes during the cryopreservation of boar spermatozoa. *Journal of Andrology*, v.26, n.5, p.610-618, 2005.
- CROWELL, S.R. *Evaluating temperature effects and extension cooling rates on boar semen quality*. 2009. 159f. 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, n.1, p.39-46, 1994.
- CUTLER, R.S.; FAHY, V.A.; SPICER, E.M. Preweaning mortality. In: LEMAN, A.D.; STRAW, B.E.; MENGELING, W.L. *et al.* (Eds). *Diseases of swine*. 7.ed. Ames: Iowa State University Press, 1992. p.847-860.
- D'ALLAIRE, S.; LEMAN, A.D.; DROLET, R. Optimizing longevity in sows and boars. *The Veterinary Clinics of North*

- America, Food Animal Practice*, v.8, n.3, p.545-558, 1992.
- DALIN, A.M. Ovarian follicular activity during the luteal phase in gilts. *Journal of Veterinary Medicine Association*, v. 34, n.1-10, p.592-601, 1987.
- DARIN-BENNET , A.; WHITE, I.G. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold shock. *Cryobiology*, v.14, n.4, p.466-470, 1977.
- 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, n.5, p.543-552, 2006.
- DE LEEUW, F.E.; COLENBRANDER, B.; VERKLEIJ, A. The role membrane damage plays in cold shock and freezing injury. *Reproduction in Domestic Animals*, suppl.1, p.95-104, 1990.
- DE RENSIS, F.; COSGROVE, J.R.; FOXCROFT, G.R. Luteinizing hormone and prolactin responses to naloxone vary with the stage of lactation in the sow. *Biology of Reproduction*, v.48, n.5, p.970-976, 1993.
- DE RENSIS, F.; BENEDETTI, S.; SILVA, P. *et al.* Fertility of sows following artificial insemination at a gonadotrophin-induced oestrus coincident with weaning. *Animal Reproduction Science*, v.76, n.3-4, p.245-250, 2003.
- DEGESTEIN, K.L.; O'DONOGHVE, R.; PATTERSON, J.L. *et al.* Synchronization of ovulation in cyclic gilts with porcine luteinizing hormone (pLH) and its effect on reproductive function. *Theriogenology*, v.70, n.7, p.1075-1085, 2008.
- DESCHAMPS, J.C.; CORRÊA, M.N.; LUCIA, T. Jr. Impacto da inseminação artificial em suínos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.22, n.2, p.75-79. 1998.
- DESJARDINS, C.; HAFS, H.D. Motility and fertility during post-thawing storage of bovine spermatozoa frozen concentrated, thawed, and re-extended. *Journal of Dairy Science*, v.45, n.10, p.1242-1247, 1962.
- DEWEY, C.E.; MARTINS, S.W.; FRIENDSHIP, R.M. *et al.* The effect on litter size of previous lactating length and previous weaning to conception interval in Ontario swine. *Preventive Veterinary Medicine*, v.18, n.3, p.213, 1994.
- 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. *et al.* (Eds). *Diseases of swine*. 7.ed. Ames: Iowa State University Press, 1992. p.88-137.
- DIDION, B.A. Computer-assisted semen analysis and its utility for profiling boar semen samples. *Theriogenology*, v.70, n.8, p.1374-1376, 2008.
- DIEMER, T.; WEIDNER, W.; MICHELMANN, H.W. *et al.* Influence of *Escherichia coli* on motility parameters of human spermatozoa in vitro. *International Journal of Andrology*, v.19, n.5, p.271-277, 1996.
- DONADEU, M. Advances in male swine artificial insemination (AI) techniques. *The Pig Journal*, v.54, p.110-122, 2004.
- DUMESNIL DU BUISSON, F. Conservation du sperme de verrat après dilution et maintien de son pouvoir fécondant. *Annales de Zootechnie*, v.5, p.195, 1956.
- DUMESNIL DU BUISSON, F.; DAUZIER, L. Données expérimentales sur l'insemination naturelle et artificielle de la

- truie. IN: INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION, 3, 1956, Cambridge, *Proceedings...* Cambridge: Brown Knight & Truscott, 1956. p.62.
- DUMESNIL DU BUISSON, F.; SIGNORET, J.P. Utilization du sperm de verrat pour insemination artificielle. *Symposium Zagreb*, v.41, 1971.
- DUSZA, L.; TILTON, J.E. Role of prolactin in the regulation of ovarian function in pigs. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, v.40, p.33-45, 1990.
- DZIENKONSKA, A.; FRASER, L.; STRZEZEK, J. Effect of different storage temperature on the metabolic activity of spermatozoa following liquid storage of boar semen. *Journal of Animal and Feed Sciences*, v.18, n.4, p.638-649, 2009.
- DZIUK, P. J.; HENSHAW, G. Fertility of boar semen artificially inseminated following in vitro storage. *Journal of Animal Science*, v.17, n.3, p.554, 1958.
- DZIUK, P.J. Dilution and storage of boar semen. *Journal of Animal Science*, v.17, n.3, p.548-553, 1958.
- DZIUK, P.J.; BAKER, R.D. Induction and control of ovulation in swine. *Journal of Animal Science*, v.21, n.4, p.697-699, 1962.
- EDWARDS, S. ; FOXCROFT, G.R. Endocrine changes in sows weaned at two stages of lactation. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.67, n.1, p. 161-172, 1983.
- EGBUNIKE, G. N.; ELEMOMO, A. O. Testicular and epididymal sperm mesenes of crossbreed European boars raised and maintained in the humid tropics. *Journal of Reproductive and Fertility*, v.54, n.2, p.245-248, 1978.
- EINARSSON, S.; MADEJ, A.; STERNING, M. Factors regulating initiation of oestrus in sows. *Reproduction in Domestic Animals*, v.33, n.3-4, p.119-123, 1998.
- ELSAESSER, F.E. ; PARVIZI, N. Partial recovery of the stimulatory oestrogen feedback action on LH release during lactation in the pig. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.59, n.1, p.63-67, 1980.
- 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, n.8, p.1593-1605, 2001.
- ESBENSHADE, K.; BRITT, J.; ARMSTRONG, J. *et al.* Body condition of sows across parities and relationship to reproductive performance. *Journal of Animal Science*, v.62, n.5, p.1187-1193, 1986.
- ESTAÇÃO Sobradinho. 2011 Disponível em: <<http://www.agritempo.gov.br/agroclima/suario>>. Acessado em 2011.
- 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. *Reproductive Biology*, v.7, n.3, p.221-231, 2007.
- ESTILL, C.T. Current concept in estrus synchronization in swine. *Journal of Animal Science*, v.77, n.1-9, p.1-9, 2000.
- EVANS, R.J.; BANDEMER, S.L.; DAVIDSON, J.A. *et al.* Binding of lipid to protein in the low-density lipoprotein from the hen's egg. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 164, n.3, p.566-574, 1968.
- EVENSON, D.P.; PARKS, J.E.; KAPROTH, M.T. *et al.* Rapid determination on sperm cell concentration in bovine semen by flow cytometry. *Journal of Dairy Science*, v.76, n.1, p.86-94, 1993.
- FAHMY, M.H. Factors influencing the weaning to oestrus interval in swine: a

- review. *World Review of Animal Production*, v.17, n.2, p.15-28, 1981.
- FAHMY, M.H.; HOLTMANN, W.B.; BAKER, R.D. Failure to recycle after weaning and weaning to oestrus in crossbred sows. *Animal Production*, v.29, n.2, p.193-202, 1979.
- FALCETO, M.V., UBEDA, J.L., MURILLO, D. *et al.* Comparison of the effects of cloprostenol (Planate) and dinoprost on the smooth muscle of sow's uterus. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 21.,2010 Vancouver, Canada. *Proceedings...* Vancouver: IPVS, 2010. p. 1108.
- FAWCETT, D.W.; ITO, S. The fine structure of bat spermatozoa. *American Journal of Anatomy*, v.116, n.3, p.567, 1965.
- FIRST, N.L.; SHORT, R.E.; PETERS, J.B. *et al.* Transport and loss of boar spermatozoa in the reproductive tract of the sow. *Journal of Animal Science*, v.27, n.4, p.1037, 1968.
- FISCHER, K.A., SAFRANSKI, T.J., VAN LEYEN, K. *et al.* Components of lipoxygenase and ubiquitin-dependent pathways for organelle degradation co-localize in the cytoplasmic droplet of mammalian spermatozoa. *Biology of Reproduction Supplement*, v.66, p.114, 2002.
- FLOWERS, W.L. Genetic and phenotypic variation in reproductive traits of AI boars. *Theriogenology*, v.70, n.8, p.1297-1303, 2008.
- FLOWERS, W.L. Increasing fertilization rate of boars: Influence of number and quality of spermatozoa inseminated. *Journal of Animal Science*, v.80, n.E, suppl.1, p.47-53, 2002.
- FLOWERS, W.L. Management of boars for efficient semen production. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, v.52, p.67-78, 1997.
- 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.L. Water quality considerations for AI. *Pigs on Parade – Swine AI news bulletin from IMV*, v. 4, 1998.
- FOOTE, R.H. Fertility estimation: a review of past experience and future prospects. *Animal Reproduction Science*, v.75, n.1-2, p.119-39, 2003.
- FOOTE, R.H. Within-herd use of boar semen at 5°C, with a note on electronic monitoring of oestrus. *Reproduction in Domestic Animals*, v.37, n.1, p.61-63, 2002.
- FORD, J.J.; MCCOARD, S.A.; WISE, T.H. *et al.* Genetic variation in sperm production. In: ASHWORTH, C.J.; KRAELING, R.R. (Eds.). Control of pig reproduction. Nottingham: Nottingham University, 2006. p.99-112.
- FOULKES, J.A. The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 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. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.60, p.165-169, 1980.
- FOXCROFT, G.R. Nutritional and lactational regulation of fertility in sows. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, v.45, p.113-125, 1992.
- FOXCROFT, G.R.; ALMEIDA, F.; AHERNE, F. *Management of the gilt and*

- first parity sow. Part IV: nutritional management of gilts at breeding.* In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ARTIFICIAL EM SUÍNOS, 7., 2000, Foz do Iguaçu. *Proceedings...* Foz do Iguaçu: EMBRAPA Suínos e Aves, 2000. p.131-145.
- FOXCROFT, G.R.; COSGROVE, J.R.; AHERNE, F.X. Relationship between metabolism and reproduction. IN: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 14., 1996, Bologna. *Proceedings...* Bologna, Italy: International Pig Veterinary Society, 1996. p.6-9.
- FOXCROFT, G.R.; DYCK, M.K.; RUIZ-SANCHEZ, A. *et al.* Identifying useable semen. *Theriogenology*, v.70, n.8, p.1324–1336, 2008.
- FOXCROFT, G.R.; PATTERSON, J.; DYCK, M. *Improving production efficiency in a competitive industry.* Alberta, Canada: Universidade de Alberta, 2010. (Swine Reproduction-Development Program).
- FOXCROFT, G.R.; SHAW, H.J.; HUNTER, P.J. *et al.* Relationship between luteinizing hormone, follicle stimulation hormone and prolactin secretion and ovarian follicular development in the weaned sow. *Biology of Reproduction*, v.36, n.1, p.175-191, 1987.
- FRANÇA, L. R., SILVA JR., V.A.; CHIARINI-GARCIA, H. *et al.* Cell proliferation and hormonal changes during postnatal development of the testis in the pig. *Biology of Reproduction*, v.63, n.6, p.1629–1636, 2000.
- 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, n.2, p.300-318, 2005.
- FRUNZA, I.; CERNESCU, H.; KORODI, G. Physical and chemical parameters of boar sperm. *Lucrări Stiintifice Medicină Veterinară*, v. 41, n.119, p.634-640, 2008.
- 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. Review: Semen extenders used in the artificial insemination of swine. *Spanish Journal of Agricultural Research*, v.1, n.2, p.17-27, 2003.
- GADEA, J. Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. *Theriogenology*, v.63, n.2, p.431-444, 2005.
- GADELLA, B.M.; VAN GESTEL, R.A. Bicarbonate and its role in mammalian sperm function. *Animal Reproduction Science*, v.82–83, p.307–319, 2004.
- GAMA, R.D.; VIANNA, W.L.; PINESE, M.E. *et al.* Different doses of porcine luteinizing hormone in precocious puberty induction in gilts. *Reproduction in Domestic Animals*, v.40, n.5, p.433-435, 2005.
- 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. *Reproduction in Domestic Animals*, v.44, n.2, p.200-205, 2009.
- GARNER, D.L.; HAFEZ, E.S.E. Espermatozoides y plasma seminal. In: HAFEZ, E.S.E. (Eds). *Reproducción e inseminación artificial en animales*. 6.ed. México: McGraw-Hill Interamericana, 1996. p.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, n.1, p.31-40, 2001.
- GERRITSEN, R.; SOEDE, N.M.; LANGEDIJ, P. *et al.* Peri oestrus hormone profiles and follicle growth in lactating

- sows with oestrus induced by intermittent suckling. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 43, n.1, p. 1-8, 2008.
- GIBSON CD. Clinical evaluation of the boar for breeding soundness: Physical examination and semen morphology. *Compendium Continuum Education*, v.5, n.5, p.5244-5249, 1983.
- GOLDBERG, A.M.G. *Fatores de risco para a contaminação bacteriana durante a coleta do ejaculado suíno e suas consequências sobre a qualidade das doses inseminantes*. 2009. 44f. Dissertação de Mestrado (Mestre em Ciências Veterinárias – Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS.
- GORDON, I.R. *Controlled reproduction in pigs*. Wallingford: CAB International, 1997. 247p.
- GRAHAM, E.F.; RAJAMANNAN, A.H.; SCHEMEHL Jr., M.K.L. *et al.* Preliminary reports on procedure and rationale for freezing boar semen. *A.I. Digest*, v.19, n.1, p.12, 1971.
- GRAHAM, J.K. Analysis of stallion semen and its relation to fertility. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, v.12, p.119-130, 1996.
- 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, n.1, p.42-52, 1987.
- GRAHAM, J.K.; HAMMERSTEDT, R.H. Differential effects of butylated hydroxytoluene analogs on bull sperm subjected to cold-induced membrane stress. *Cryobiology*, v.29, n.1, p.106-117. 1992.
- GUEDES, R.M.C.; NOGUEIRA, R.H.G. The influence of parity order and body condition and serum hormones on weaning-to-oestrus interval of sows. *Animal Reproduction Science*, v.67, n.1-2, p.91-99, 2001.
- HANCOCK, J.L. A staining technique for the study of temperature shock in semen. *Nature*, v.167, p.323, 1951.
- HANCOCK, J.L. The morphology of boar spermatozoa. *Journal of the Royal Microscopical Society*, v.76, p.84-97, 1957.
- HANCOCK, J.L. The morphology of bull spermatozoa. *Journal of Experimental Biology*, v.29, p.445, 1952.
- HANCOCK, J.L.; HOWELL, G.J.R. The collection of boar semen. *Veterinary Record*, v.71, n.5, p.664-665, 1959.
- HANENBERG, E.H.A.T; KNOL, E.F.; MERKS, J.W.M. Estimates of genetic parameters for reproduction traits at different parities in Dutch Landrace pigs. *Livestock Production Science*, v.69, n.2, p.179-186. 2001.
- HARAYAMA, H., SHIBUKAWA, T., MIYAKE, M. *et al.* Fructose stimulates shedding of cytoplasmic droplets from epididymal boar spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development*, v.8, n.7, p.1039-1043, 1996.
- HARRISON, R.A.P.; ASHWORTH, P.J.; MILLER, N.G. Bicarbonate/CO₂, an effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes. *Molecular Reproduction and Development*, v.45, n.3, p.378-391, 1996.
- HARRISON, R.A.P.; WHITE, I.G. Glycolytic enzymes in the spermatozoa and cytoplasmic droplets of bull, boar and ram, and their leakage after shock. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.30, n.1, p.105-115, 1972.
- 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, n.1, p.65–73, 1978.
- HARTLEY, M. The ups and downs of the global pig market. In: WISEMAN, J.; VARLEY, M.A.; MCORIST, S. *et al. Paradigms in pig science*, 1. Nottingham: Nottingham University Press, 2007. p.1-10.
- HEMSWORTH, P.H. E HANSEN, C. The effects of continuous boar contact on the oestrus detection rate of weaned sows. *Applied Animal Behaviour Science*, v. 28, n.3, p. 281-285, 1990.
- HERMO L, DWORKIN J, OKO R. Role of epithelial clear cells of the rat epididymis in the disposal of the contents of cytoplasmic droplets detached from spermatozoa. *American Journal of Anatomy*, v.183, n.2, p.107–124, 1988
- HERNÁNDEZ, M.; ROCA, J.; CALVETE, J.J. *et al.* Cryosurvival and in vitro fertilizing capacity post thaw is improved when boar spermatozoa are frozen in the presence of seminal plasma from good freezer boars. *Journal of Andrology*, v.28, n.5, p.689-697, 2007.
- HIRAI, M.; BOERSMA, A.; HOEFLICH, A. *et al.* Objectively measured sperm motility and sperm head morphometry in boars (*Sus scrofa*): relation to fertility and seminal plasma growth factors. *Journal of Andrology*, v.22, n.1, p.104–10, 2001.
- HOLDER, R. B.; BATES, R.O.; LAMBERSON, W.R. Effect of decreased age at puberty on lifetime productivity of sows. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON PIG REPRODUCTION COLUMBIA. 4., 1993, Columbia. *Proceedings...* Columbia: University of Missouri, 1993. p 86.
- HOLNESS, D.H.; HUNTER, R.H.F. Post-partum oestrus in the sow in relation to the concentration of plasma oestrogens. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.45, n.1, p.15-20, 1975.
- HOLST, S.J. Sterility in boars. *Nordisk Veterinaermedicin*, v.1, p.87-120, 1949.
- HOLT, C.; HOLT, W.V.; MOORE, H.D.M. *et al.* Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: results of two fertility trials. *Journal of Andrology*, v.18, p.312-323, 1997.
- HOLT, W.V.; BRIEN, J.O.; ABAIGAR, T. Applications and interpretation of computerassisted sperm analyses and sperm sorting methods in assisted breeding and comparative research. *Reproduction, Fertility and Development*, v.19, n.6, p.709-718, 2007.
- HOLT, W.V.; MEDRANO, A.; THURSTON, L.M. *et al.* The significance of cooling rates and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. *Theriogenology*, v.63, n.2, p.370-382, 2005.
- HUGHES, P.E. ; VARLEY, M.A. *Reproduction in the pig*. London: Butterworths, 1980. p.141-144.
- HUGHES, P.E.; PEARCE, G.P.; PATERSON, A.M. Mechanisms mediating the stimulatory effects of the boar on gilt reproduction. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, v.40, p.323-341, 1990.
- HUNTER, M. G. Intralitter and peripheral steroid concentrations and conceptus development in Meishan and Large White hybrid gilts. *Reproduction, Fertility and Development*, v.6, n.6, p.783–789, 1994.
- HUNTER, R.H.F. Porcine ovulation after injection of human chorionic gonadotropin. *Veterinary Record*, v.81, n.1, p.21-23, 1967.
- HUNTER, R.H.F. Sperm transport and reservoirs in the pig oviduct in relation to the time of ovulation. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.63, n.1, p.109-117, 1981.

- HUO, L.Y.; MA, X.H.; YANG, Z.M. Assessment of sperm viability, mitochondrial activity, capacitation and acrossome intactness in extended boar semen during long-term storage. *Theriogenology*, v.58, n.7, p.1349-1360, 2002.
- HURTGEN, J.P. Reproductive examination of the boar. *Theriogenology*, v.8, p.1-48, 1984.
- ITO, S.; NIWA, T.; KUDO, A. *et al.* Studies on the artificial insemination of swine II. Observations on the semen and its storage trial. *Zootech Experiment Station Research Bulletin*, v.55, p.1-74, 1948.
- IVANOVA, M.; MOLLOVA, M. Zona-penetration in vitro test for evaluating boar sperm fertility. *Theriogenology*, v.40, n.2, p.397-410, 1993.
- JAINUDEEN, M.R. ; HAFEZ, E.S.E. *Reproduction in farm animals*. 7.ed. Lippinott Williams and Wilkins, 1993.
- JANULIS, L.; HESS, R.A.; BUNICK, D. *et al.* Mouse epididymal sperm contain active P450 aromatase wich decreases as sperm traverse the epididymis. *Journal of Andrology*, v.17, n.2, p.111-116, 1996.
- JIANG, Z.; LI, Q.; LI, W. *et al.* Effect of low density lipoproteins on DNA integrity of freezing-thawing boar sperm by neutral comet assay. *Animal Reproduction Science*, v. 99, n.3-4, p.401-407, 2007.
- JOHNSON, L. A., AALBERS, J. G.; WILLEMS, C. M. T. *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. *Journal of Animal Science*, v.54, n.1, p.132-136, 1982.
- 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. *Journal of Animal Science*, v.52, p.1130-1136, 1981.
- 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, n.2, p.49-55, 1988.
- JOHNSON, L.A.; WEITZE, K.F.; FISER, P. *et al.* Storage of boar semen. *Animal Reproduction Science*, v.62, n.1-3, p.143-172, 2000.
- JOHSEN, O; ELIASSON, R. Follicular fluid and succinate oxidation by human spermatozoa. *Andrologia*, v.8, n.4, p.283-284, 1976.
- JONES, A.R. Metabolism of lactate by mature boar spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development*, v.9, n.2, p.227-232, 1997.
- JONES, A.R.; CHANTRILL, L.A. Oxidative metabolic activity of boar spermatozoa: a system for assessing anti-glycolytic activity of potential inhibitors in vitro. *Reproduction, Fertility and Development*, v.1, n.4, p.357-367, 1989.
- JONES, A.R.; CHANTRILL, L.A.; COKINAKIS, A. Metabolism of glycerol by mature boar spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.94, n.1, p.129-134, 1992.
- JONES, R.; MANN, T. Lipid peroxides in spermatozoa: formation, role of plasmalogen and physiological significance. *Proceedings of Royal Society of London B*, v.193, p.317-333, 1976.
- JONES, R.; MANN, T.; SHERINS, R. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides and protective action of seminal plasma. *Fertility and Sterility*, v.31, n.5, p.531-537, 1979.

- JONGMAN, E. C.; HEMSWORTH, P.H.; GALLOWAY, D.B. The influence of conditions at the time of mating on the sexual behaviour of male and female pigs. *Applied Animal Behavior Science*, v.48, n.3-4, p.143-150, 1996.
- KAPLAN, M.; RUSSEL, L.D.; PETERSON, R.N. *et al.* Boar sperm cytoplasmic droplets: their ultrastructure, their numbers in the epididymis and at ejaculation and their removal during isolation of sperm plasma membranes. *Tissue and Cell*, v.16, n.3, p.455-468, 1984.
- 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. *Animal Breeding Abstracts*, 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. *Journal of Reproduction and Development*, v.42, n.4, p.237-241, 1996.
- KATZER, L.H.; BERNARDI, M.L.; BORTOLOZZO, F.P. *et al.* Viabilidade de semen suíno armazenado a 5°C de acordo com a taxa de resfriamento e incubação prévia. *Ciência Rural*, v.35, n.1, p.138-144, 2005.
- KAUFFOLD, J.; GOTTSCHALK, J.; SCHNEIDER, F. *et al.* Effects of feeding level during lactation on FSH and LH secretion patterns, and follicular development in primiparous sows. *Reproduction in Domestic Animals*, v.43, n.2, p.234-238, 2008.
- KAYSER, J.P.; AMANN, R.P.; SHIDELER, R.K. Effects of linear cooling rate on motion characteristics of stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v.38, n.4, p.601-614, 1992.
- KEMP, B.; SOEDE, N.M. Relationship of weaning-to-estrus interval to timing of ovulation and fertilization in sows. *Journal of Animal Science*, v.74, n.5, p.944-949, 1996.
- KEMP, B.; SOEDE, N.M.; HAZELEGER, W., 1998. CONTROL OF OVULATION. In: Wiseman, J., Varley, M.A., Chadwick, J.P. (Eds.), *Progress of Pig Science*. Nottingham University Press, pp. 285-302.
- KEMP, B.; SOEDE, N.M.; LANGENDIJK, P. Effects of boar contact and housing conditions on estrus expression in sows. *Theriogenology*, v.63, n.2, p.643-656, 2005.
- KENNEDY, B.W.; WILKINS, J.N. Boar breed and environmental factors influencing semen characteristics of boars used in artificial insemination. *Canadian Journal of Animal Science* v.64, n.4, p.833-43, 1984.
- KILLEN, J.H.; CHRISTENSON, R.K.; FORD, J.J. Ovarian follicular changes after weaning in sow. *Journal of Animal Science*, v.70, n.9, p.2801-2808, 1992.
- KILLIAN, G.J.; CHAPMAN, D.A.; ROGOWSKI, L.A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. *Biology of Reproduction*, v.49, n.6, p.1202-1207, 1993.
- KIM, S.H.; KIM, K.J.; LEE, J.K. *et al.* Studies on the preservation of boar semen. III Studies on the development of dilute for liquid semen. *Korean Journal of Animal Science*, v.18, n.5, p.397-402, 1976.
- KIM, S.H.; KYEONG, J.K.; PARKS, H.K. Studies on the preservation of boar semen. IV Studies on the improved diluents for liquid semen. *Korean Journal of Animal Science*, v.19, n.4, p.267-274, 1977.
- KING, G.J.; MACPHERSON, J.W. Alkaline and acid phosphatase activity, pH and osmotic pressure of boar semen. *Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science*, v.30, n.11, p.304-307, 2005.
- KING, R.H.; WILLIAMS, I.H.; BAKER, T. The effect of diet during lactation on the reproductive performance of first-litter

- sows. *Proceedings of the Australian Society of Animal Production*, v.15, p.412-415, 1984.
- KIRKWOOD, R.N.; VADNAIS, M.L.; ABAD, M. Practical application of seminal plasma. *Theriogenology*, v.70, n.8, p.1364-1367, 2008.
- 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. *Journal of Animal Science*, v.80, n.4, p.892-899, 2002.
- KNOX, R.V.; RODRIGUEZ-ZAS, S.L. Factors influencing estrus and ovulation in weaned sows as determined by transrectal ultrasound. *Journal of Animal Science*, v.79, n.12, p.2957-2963, 2001.
- KNOS, R.V. Recruitment and selection of ovarian follicles for determination of ovulation rate in the pig. *Domestic Animals Endocrinology*, v.29, n.2, p.385-397, 2005.
- KOKETSU, Y.; DIAL, G.D. Factors influencing the postweaning reproductive performance of sows on commercial farms. *Theriogenology*, v. 47, n.7, p.1445-1461, 1997.
- KOKETSU, Y.; DIAL, G.D. Interactions between the associations of parity, lactation length and weaning to conception interval with subsequent litter size in swine herds using early weaning. *Preventive Veterinary Medicine*, v.37, n.1-4, p. 113-120, 1998.
- KOKETSU, Y.; DIAL, G.D.; KING, V.L. Influence of various factors on farrowing rate on farms using early weaning. *Journal of Animal Science*, v.75, n.12, p. 2580-2587, 1997.
- KOKETSU, Y.; DIAL, G.D.; PETTIGREW, J.E. *et al.* Feed intake pattern during lactation and subsequent reproductive performance of sows. *Journal of Animal Science*, v.74, n.10, p.2875-2884, 1996.
- 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 Veterinaria Scandinavica*, v.43, p.49-55, 2002.
- KONDRACKI, S. Breed differences in semen characteristics of boars used in artificial insemination in Poland. *Pig News Information*, v.24, p.119-122, 2003.
- KONIG, I. *Biología técnica: inseminación de la cerda*. 3.ed. Zaragoza: Ascribia, 1979. 200p.
- 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. *Animal Reproduction Science*, v.52, n.1, p.71-79, 1998.
- KRUEGER, C.; RATH, D.; JOHNSON, L.A. Low dose insemination in synchronized gilts. *Theriogenology*, v.52, n.8, p.1363-1373, 1999.
- KRUGER, T. F.; DUTOIT, T. C.; FRANKEN, D. R. *et al.* A new computerized method of reading sperm morphology is as efficient as technician reading. *Fertility Sterility*, v. 59, n.1, p. 202-209, 1993.
- KUBUS S.A. Elaboración de dosis seminales .Disponível em: < ww.kubus-sa.com/esp/04/archivos/fichero14_1.pdf>. Acessado em 24 de agosto de 2010.
- 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: ABRAVES, 2003. p. 189-190.
- KUNAVONGKRIT A.; EDQVIST, L.E.; EINARSSON, S. Clinical and endocrinological studies in primiparous zero-weaned sows. 3. Hormonal patterns of

- ovarian disorders due to zero-weaning. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe A*, v.30, n.8, p.625-636, 1983.
- KUNAVONGKRIT, A. *Clinical, morphological and endocrinological studies in primiparous post partum sows*. 1984. nf. Thesis (doctoral) - Departments of Obstetrics and Gynaecology, Clinical Chemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.
- KUNAVONGKRIT, A.; EINARSSON, S.; SETTERGREN, I. Follicular developments in primiparous lactating sows. *Animal Reproduction Science*, v.5, n.1, p.47-56, 1982.
- KUSTER, C.E.; ALTHOUSE, G.C. The fecundity of porcine semen stored for 2 to 6 days in AndrohepR and X-cellTM extenders. *Theriogenology*, v.52, n.3, 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, n.3, p.340-347, 2004.
- KVIST, U.; BJORND AHL, L. Zinc preserves an inherent capacity for human sperm chromatin decondensation. *Acta Physiologica Scandinavica*, v. 124, p. 195-200, 1985.
- KVIST, U.; KJELLBERG, S.; BJORND AHL, L. *et al.* Seminal fluid from men with agenesis of the wolffian ducts: zinc-binding properties and effects on sperm chromatin stability. *International Journal of Andrology*, v.13, n.4, p.245-252, 1990.
- LANDSVERK, K. Packaging and distribution - their impact on fertility. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BOAR SEMEN PRESERVATION, 4., 1999, Beltsville, Maryland, USA. *Proceedings...* Lawrence: Allen, 2000. p.137-139.
- LANGENDIJK, P.; SOEDE, N.M.; BOUWMAN, E.G. *et al.* Responsiveness to boar stimuli and change in vulvar reddening in relation to ovulation in weaned sows. *Journal of Animal Science*, v.78, n.12, p.3019-3026, 2000.
- LAPIERRE, M. Artificial insemination: oestrus detection, timing, technique and application. In: SWINE ARTIFICIAL INSEMINATION CONFERENCE, 1994, Leman. *Proceedings...* Leman: Swine University of Minnesota, 1994. p. 19-32.
- LARSON, R.E.; CRABO, B.; LEMAN, A.D. Physical and chemical influences on loss of the cytoplasmic droplet (CD) from porcine spermatozoa during ejaculation. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 9., 1980, Madrid. *Proceedings...* Madrid: ICAR, 1980. v. 5, p. 45–48.
- LARSSON, K.; DARENTIUS, K.; JOHANSSON, K. Sperm morphology and in vitro viability in diluted semen in relation to fertility of AI boars. *Nordisk Veterinary Medicine*, v.32, n.12, p.533-542, 1984.
- LARSSON, K.; EINARSSON, S. Influence of boars on the relationship between and post thawing sperm quality of deep frozen boar spermatozoa. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v.17, n.1, p.74-82, 1976.
- LASLEY, F.; BOGART, R. A comparative study of epididymal and ejaculated spermatozoa of the boar. *Journal of Animal Science*, v.3, n.3, p.360-370, 1944.
- LASLEY, J.F.; EASLEY, G.T.; BOGART, R. Some factors influencing the resistance of bull sperm to unfavorable environmental conditions. *Journal of Animal Science*, v.1, n.1, p.79, 1942 (Abstract).
- LASLEY, J.F.; EASLEY, G.T.; MCKENZIE, F.F. A staining method for the differentiation of live and dead

- spermatozoa. I. Applicability to the staining of ram spermatozoa. *The Anatomical Record*, v.82, n.2, p.167, 1942.
- LAVON, U.; BOURSNELL, J.C. The split ejaculate of the boar: contributions of the epididymides and seminal vesicles. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.42, n.3, p.541-552, 1975.
- LAZ ROZAS. *Manual de inseminacion artificial porcina*. Madrid: 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. *Livestock Production Science*, v.57, n.3, p.243-253, 1999.
- LESHIN, L.S.; RAJ, S.M.; SMITH, C.K. *et al.* Immunostimulatory effects of pig seminal proteins on pig lymphocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.114, n.1, 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. *Proceedings...* Lincoln: IANR, 1997. p.58-74.
- LEVIS, D.G. 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: Allen Press, 2000. p.121-128.
- LEWIES, L.L. The viability of reproductive cells. *Agricultural Experiment Station Bulletin*, n.96, 1911.
- LINDHOLMER, C. The importance of seminal plasma for human sperm motility. *Biology Research*, v.10, n.5, p.533-542, 1974a.
- LINDHOLMER, C. Toxicity of zinc ions to human spermatozoa and the influence of albumin. *Andrologia*, v.6, n.1, p.7-16, 1974b.
- LIU, Z.; FOOTE, R.H. Bull sperm motility and membrane integrity in media varying in osmolality. *Journal of Dairy Science*, v.81, n.7, p.1868-1873, 1998.
- LOPES, P.S. Melhoramento genetico de suínos <<http://www2.ufersa.edu.br/portal/view/uploads/setores/183/arquivos>> Assesso em 1 de Julho de 2011.
- 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. *American Journal of Veterinary Research*, v.29; n.2, 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. *Preventive Veterinary Medicine*, v.53, n.4, p.285-292, 2002.
- LUCY, M.C., LIU, J., KOENISFELD, A.T. *et al.* Ultrasonically-measured ovarian follicular development in weaned sows. *Biology of Reproduction Supplement*, v.60, n.231, p.166, 1999. (Abstract).
- 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. *Swine Health and Production*, 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. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.63, n.2, p.407-414, 1981.
- MACHADO, E.S.; MACHADO, J.V.; MAYRINK, R.R. Experiência com desmame precoce em granjas brasileiras. 1- Aspectos Reprodutivos. IN: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO E

- INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM SUÍNOS, 7., 2000, Foz do Iguaçu. *Anais...* Foz do Iguaçu, PR: Embrapa Suínos e Aves, 2000. p.279-294.
- MACHÁTY, Z.; TAKÁCS, T.; GÁTHY. Fertilizing capacity of boar semen diluted with Beltsville TS (BTS) and modified Kiev (MK) extenders in relation to storage time and number of spermatozoa per insemination dose. *Animal Reproduction Science*, v. 29, n. 3-4, p. 289-295, 1992.
- MACMILLAN, K.L.; SHANNON, P.; HART, N.L. The redilution of deep frozen bull semen. *Animal Production*, v.26, n.1, p.67-73, 1978.
- 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: SBZ, 2000, p. 649.
- MANASKOVA, P.; LIBERDA, J.; TICHA, M. *et al.* Isolation of non-heparin-binding and heparin-binding proteins of boar prostate. *Journal of Chromatographic B*, v.770, p.137-143, 2002.
- MANJUNATH, P.; CHANDONNET, L.; LEBLOND, E. *et al.* Major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. *Biology of Reproduction*, v.50, n.1-2, p.27-37, 1994.
- MANJUNATH, P.; THERIEN, I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *Journal of Reproductive Immunology*, 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.; LUTVCAK-MANN, C. Biochemical changes underlying the phenomenon of cold shock in spermatozoa. *Archivio di Scienze Biologiche*, v.39, n.6, p.578, 1955.
- MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. *Male reproductive function and semen: themes and trends in physiology, biochemistry and investigative andrology*. Berlin: Springer-Verlag, 1981. 495p.
- MANUAL para exame andrológico e avaliação do sêmen animal. 2. ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998, 49p.
- MARCHETTI, A.N. Qualidade da água utilizada em laboratórios de centrais de inseminação artificial. In: *Curso de inseminação artificial em suínos*. Porto Alegre: Minitub e UFRGS, 2008.
- MARÍN, S.; CHIANG, K.; BASSILIAN, S. *et al.* Metabolic strategy of boar spermatozoa revealed by a metabolomic characterization. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, v.554, n.3, p.342–346, 2003.
- MARTINAT-BOTTÉ, P.; BARITEAU, F.; FORGERIT, Y. *et al.* Controle f estrus with progestagen altrenogest (Regumate®): effect on fertility and litter size. *Animal Reproduction Science*, v.22, n.3, p.227-233, 1990.
- MARTINAT-BOTTÉ, P.; VENTURI, E.; GULLOET, P. *et al.* Induction and synchronization of ovulations in nulliparous and multiparous sows with an injection of gonadotropin releasing hormone agonist (Receptal®). *Theriogenology*, v.73, n.3, p.332-342, 2010.
- MARTINEZ, E.A.; VAZQUEZ, J.M.; MATAS, C. *et al.* Evaluation of boar spermatozoa penetrating capacity using pig oocytes at the germinal vesicle stage. *Theriogenology*, v.40, n.3, p.547-557, 1993.
- MARTINEZ, E.A.; VAZQUEZ, J.M.; PARRILLA, I. *et al.* Incidence of unilateral fertilizations after low dose deep

- intrauterine insemination in spontaneously ovulating sows under field conditions. *Reproduction in Domestic Animals*, v.41, n.1, p.41-47, 2006.
- MARTINEZ, E.A.; VAZQUEZ, J.M.; ROCA, J. *et al.* Minimum number of spermatozoa required for normal fertility after deep intrauterine insemination in non-sedated sows. *Reproduction*, v.123, n.1, p.163-170. 2002.
- MARTINEZ, E.A.; VAZQUEZ, J.M.; ROCA, J. Successful non-surgical deep intrauterine insemination with small numbers of spermatozoa in sows. *Reproduction*, v.122, n.2, p.289-296, 2001.
- MARTÍN-HIDALGO, D.; BARÓN, F.J.; BRAGADO, M.J. *et al.* The effect of melatonin on the quality of extended boar semen after long-term storage at 17°C. *Theriogenology*, v.75, n.8, p.1550-1560, 2011.
- MARTÍN-RILLO, S.; GRANADOS, L.; RUVALCABA, J.A.G.; LA Porcina: Situación actual y tecnología. In: CONGRESO NACIONAL DE REPRODUCCIÓN PORCINA. 3., 1994. Rosário, Argentina. *Anais...* Rosário, Argentina: IPVS, 1994, p.65-78.
- MARTÍN-RILLO, S.; MARTINEZ, E.; GARCIA ARTIGA, C. Boar semen evaluation in practise. *Reproduction in Domestic Animals*, v.31, n.2, p.519-526, 1996.
- MARTÍN-RILLO, S.; SHOKOUHI, V.; GARCIA BOIX, E. *et al.* Contamination of semen doses and its possible relationship with the bacterial flora of the prepuce. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY, 3., 1998, Birmingham, UK. *Proceedings...* Birmingham: IPVS, 1998. p.60.
- MASSANYI, P.; TRANDZIK, J.; NAND, P. *et al.* Seminal concentrations of trace elements in various animals and their correlations. *Asinal Journal of Andrology*, v.5, p.101-104, 2003.
- MAURER, R.R.; FORD, J.J.; CHRISTENSEN, R.K. Interval to first postweaning estrus and causes for leaving the breeding herd in Large White, Landrace, Yorkshire e Chester White, females after three parities. *Journal of Animal Science*, v.61, n.6, p.1327-1334, 1985.
- MAXWELL, W.M.C.; JOHNSON, L.A. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. *Theriogenology*, v.52, n.8, p.1353-1362, 1999.
- MAYER, D.T. The chemistry and certain aspects of metabolic activities of mammalian spermatozoa. *Reproduction and Infertility*, v.45, p.45-53, 1955.
- MAZUR, P. Basic concepts in freezing cells. IN: Johnson, L.A.; Larsson, K. (Eds), Deep Freezing of Boar Semen. INTERNATIONAL CONFERENCE ON DEEP FREEZING OF BOAR SEMEN, 1., 1985, Uppsala. *Proceedings...* Uppsala: Swedish University Agricultural Science, 1985. p.91-111.
- 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. *Journal of Veterinary Medicine Serie A*, v.42, n.4, p.285-292, 1995.
- MCKENZIE, F. F.; MILLER, J. C.; BAUGUESS, L. C. The reproductive organs and semen of the boar. Columbia, Mo.: University of Missouri, College of Agriculture, Agricultural Experiment Station, 1938.
- MEDRANO, A.; PEÑA, A; RIGAU, T. *et al.* Variations in the proportion of glycolitic/non-glycolytic energy substrates modulate sperm membrane integrity and function in diluted boar samples stored at

15-17°C. *Reproduction in Domestic Animals*, v.40, n.5, p.448-453, 2005.

MEJIA-GUADARRAMA, C.A.; PASQUIER, A.; DOURMAD, J.Y. *et al.* Protein (lysine) restriction in primiparous lactating sows: effects on metabolic state, somatotropic axis, and reproductive performance after weaning. *Journal of Animal Science*, v.80, n.12, p.3286-330, 2002.

MERKS J. W. M. AND MOLENDIJK R. J. F. Genetic correlations between production traits and first parity traits. In: ANNUAL MEETING OF THE EUROPEAN ASSOCIATION FOR ANIMAL PRODUCTION, 46., 1995, Prague - Czech Republic. *Proceedings...* Prague: EAAP, 1995 Abstract., p.4-11.

METZ, K.W.; BERGER, T.; CLEGG, E.D. Adsorption of seminal plasma proteins by boar spermatozoa. *Theriogenology*, v.34, n.4, p.691-700, 1990.

MILOVANOV, V.K. Provision of artificial insemination units with warming facilities. *Ovcevodstvo* (Moscow), v.6, p.7, 1932.

MOORE, H.D.M.; HALL, G.A.; HIBBITT, K.G. Seminal plasma proteins and the reaction of spermatozoa from intact boars and from boars without seminal vesicles to cooling. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.47, n.1, p.39-45, 1976.

MORAN, D.M., JASKO, D.J., SQUIRES, E.L. *et al.* Determination of temperature and cooling rate which induce cold shock in stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v.38, n.6, p.999-1012, 1992.

MORROW, D.A. *Current therapy in theriogenology: diagnosis, treatment and prevention of reproductive diseases in small and large animals*. 2. ed. Saunders Company, 1986. 1143p.

MORROW, W.E.M. Semen extension: a comparison of methods. *Swine News*, v.28, 2005.

MUIRHEAD, M.R., ALEXANDER, T.J.L. *Managing pig health and the treatment of disease: a reference for the farm*. Sheffield: 5M Enterprises, 1997. 610p.

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. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.52, n.2, p.141-146, 1998.

NEVO, A.C.; POLGE, C.; FREDERICK, G. Aerobic and anaerobic metabolism of boar spermatozoa in relation to their motility. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.22, n.1, p.109-118, 1970.

NEWTH, M.S.; LEVIS, D.G. *Change in pH boar semen extenders*. Lincoln: University of Nebraska, 1999. (Nebraska Swine Report).

NEWTON, E.A.; STEVENSON, J.S.; MILTON, J.E. *et al.* Endocrine changes before and after weaning in response to boar exposure and altered suckling in sows*. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.81, n.2, p.599-609, 1987.

NIWA, T. Research and practice in the artificial insemination of pigs. IN: CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION, 4, 1961, The Hague, *Proceedings...* The Hague: [s.n.], 1961. v.1, p.83.

NIWA, T.; ITO, S.; KUDO, A. *et al.* Techniques of artificial insemination with swine in Japan. *Annales de Zootechnie*, v.8, suppl., p.97-103, 1959.

NOVAK, S.; RUIZ-SÁNCHEZ, A.; DIXON, W. T. *et al.* Seminal plasma proteins as potential markers of relative fertility in boars. *Journal of Andrology*, v.31, n.2, p.188-200, 2010.

OBERLENDER, G.; MURGAS, L.D.S.; MESQUITA, S.P. Inseminação artificial em suínos. *Boletim Técnico da UFLA*, n.79, p.1-16, 2008.

- OHATA, P.M.; BERNARDI, M.L.; REIS, G.R. *et al.* Congelabilidade do semen suíno de acordo com o período de equilíbrio pré-congelamento e da sensibilidade ao resfriamento. *Archives of Veterinary Science*, v.10, n.1, p.69-74, 2005.
- OKA, A.; MITA, A.; SAKURAI-YAMATANI, N.; YAMAMOTO, H. *et al.* Hybrid breakdown caused by substitution of the X chromosome between two mouse subspecies. *Genetics*, v.166, n.2, p.913-924, 2004.
- OKERE, C. Impact of modern reproductive technologies on productivity in pigs: a review. In: FOCUS ON THE FUTURE CONFERENCE, 2001, Red Deer, Canadá. *Proceedings...* Red Deer: [s.n.], 2001. p.49-65.
- OVERSTREET, J.W.; COOPER, G.W. Sperm transport in the reproductive tract of the female rabbit. I. The rapid transit phase of transport. *Biology of Reproduction*, v.19, n.1, p.101-114, 1978.
- OYEYEMI, M. O.; UBIOGORO, O. Spermogram and morphological characteristics in testicular and epididymal spermatozoa of Large boar in Nigeria. *International Journal of Morphology*, v.23, n.3, p.235-9, 2005.
- PACE, M.M.; GRAHAM, E.F. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. *Journal of Animal Science*, v.39, n.6, p.1144-1149, 1974.
- PACE, M.M.; SULLIVAN, J.J.; ELLIOTT, F.I. *et al.* Effects of thawing temperature, number of spermatozoa and spermatozoal quality on fertility of bovine spermatozoa packaged in 0-5 ml French straws. *Journal of Animal Science*, v.53, n.4, p.693-701, 1981.
- 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. 246f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- PALMER, E. Factors affecting stallion semen survival and fertility. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 10., 1984, Urbana, *Proceedings...* Urbana: University of Illinois, 1984. v.3, p.377-379.
- PALMER, W.M.; TEAGUE, H.S.; VENZKE, W.G. Histological changes in the reproductive tract of the sow during lactation and early postweaning. *Journal of Animal Science*, v.24, n.4, p.1117-1125, 1965b.
- PALMER, W.M.; TEAGUE, H.S.; VENZKE, W.G. Macroscopic observations on the reproductive tract of the sow during lactation and early postweaning. *Journal of Animal Science*, v.24, p.541-545, 1965a.
- PAQUIGNON, M. Semen technology in the pig. *Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science*, v.30, p.202-218, 1984.
- PAQUIGNON, M.; BUSSIÈRE, J.; BARITEAU, F. Résultats récents en matière de technologie de la conservation de la semence de verrat. *Journées Recherches Porcine en France.*, v.19, p.63-78, 1987.
- PAULENZ, H.; GREVLE, I.S.; TVERDAL, A. *et al.* Precision of the Coulter Counter for routine assessment of boar-sperm concentration in comparison with the haemocytometer and spectrophotometer. *Reproduction in Domestic Animals*, v.30, n.3, p.107-111, 1995.
- PAULENZ, H.; KOMMISRUDE, E.; HOFMO, P.O. Effect of long-term storage at different temperatures on the quality of

- liquid boar semen. *Reproduction in Domestic Animals*, v.35, n.2, p.83-87, 2000.
- PELLAND, C. *A study using timed ovulation with intrauterine insemination and reduced sperm concentration in sows*. 2007. 83f. Thesis (Master of Science) - The Faculty of Graduate Studies, University of Guelph, Canadá.
- 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. *Animal Reproduction Science*, v.78, n.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, n.2, 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, n.1, p.63-70, 2004b.
- PEÑA, F.J.; SARAVIA, F.; GARCÍA-HERREROS, M. *et al.* Identification of sperm morphometric subpopulations in two different portions of the boar ejaculate and its relation to postthaw quality. *Journal of Andrology*, v.26, n. 6, p.716-723, 2005.
- PEÑA, F.J.; SARAVIA, F.; NUÑEZ-MARTINEZ, I. *et al.* Do different portions of the boar ejaculate vary in their ability to sustain cryopreservation? *Animal Reproduction Science*, v.93,n.1, p.101-113, 2006.
- 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. *Reproduction in Domestic Animals*, v.26, n.3, p112- 116, 1991.
- 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
- PETCHEY, A.M. ; ENGLISH, P.R. A note on the effects of the boar presence on the performance of sows and they litters when penned in groups in late lactation. *Animal Production*, v.32, n.1, p.107-109, 1980.
- PETRUNKINA, A.M., SIMON, K., GUNZEL-APEL, A.R. *et al.* Kinetics of protein tyrosine phosphorylation in sperm selected by binding to homologous and heterologous oviductal explants: how specific is the regulation by the oviduct? *Theriogenology*, v.61, n.9, p.1617-1634, 2004.
- PETRUNKINA, A.M.; WABERSKI, D.; GUNZEL-APEL, A.R. *et al.* Determinants of sperm quality and fertility in domestic species. *Reproduction*, v.134,n.1, p.3-17, 2007.
- PHILLIPS, P.H. The preservation of bull semen. *Journal of Biology and Chemistry*, v.130,p.415, 1939.
- PHILPOTT, M. The dangers of disease transmission by artificial insemination and embryo transfer. *British Veterinary Journal*, v.149, n.4, p.339-369, 1993.
- PICKETT, B.W. Retrospective and review. *Biology Reproduction Monographys*, v.1, p.547-564, 1995.
- 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. *Animal Reproduction Science*, v.55, n.3-4, p.269-278, 1999.
- PLISKO, N.T. Method of prolonging the viability and fertilizing capacity of boar spermatozoa. *Svinovodstvo*, v.9, n.2, p.37-41, 1965.

- POLEZE, E. *Caracterização do interval desmame – estro e efeito de sua variação no desempenho reprodutivo de fêmeas suínas*. 2004. 66f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias – Reprodução Animal) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.
- 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. *Proceedings...* Hamburg: IPVS, 2004. v.2, p.475.
- POLGE, C. The development of an artificial insemination service for pigs. *Animal Breeding Abstracts*, v.24, p.209, 1956a.
- POLGE, C. Artificial insemination in pigs. *Veterinary Record*, v.68, p.62-75, 1956b.
- POLGE, C.; SMITH, A.U.; PARKES, A.S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, v. 164, n.4172, p. 666-668, 1949.
- POPE, W. F.; XIE, S.; BROERMANN, D.M. *et al.* Causes and consequences of early embryonic diversity in pigs. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, v. 40, p.251–260, 1990.
- PRIVADO FILHO, J.R.; TONIOLLO, G.H. Aspectos reprodutivos de fêmeas suínas primíparas e secundíparas em Rio Verde – Goiás. *Ars Veterinaria*, v.27, n.1, p.56-65, 2011.
- 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, n.8, p.2219–2232, 2005.
- PRUNIER, A.; MARTINAT-BOTTE, F.; RAVAUULT, J.P. *et al.* Perioestrous patterns of circulating LH, FSH, prolactin and oestradiol-17 β in the gilt. *Animal Reproduction Science*, v.14, n.3, p.205–218, 1987.
- PUKAZHENTHI, B.; NOILES, E.; PELICAN, K. *et al.* Osmotic effects on feline spermatozoa from normospermic versus teratospermic donors. *Cryobiology*, v.40, n.2, p.139-150, 2000.
- PURSEL, V.G., JOHNSON, L.A.; RAMPACEK, G.B. Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. *Journal of Animal Science*, v.34, n.2, p. 278–283, 1972.
- PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A. Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *Journal of Animal Science*, v.40, n.1, p.99-102, 1975.
- PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A.; SCHULMAN, L.L. Effect of dilution, seminal plasma and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa. *Journal of Animal Science*, v.37, n.2, p.528-531, 1973.
- PURSEL, V.G.; PARKS, S. Freezing and thawing procedures for boar spermatozoa. IN: INTERNATIONAL CONFERENCE ON DEEP FREEZING OF BOAR SEMEN, 1., 1985, Uppsala. *Proceedings...* Uppsala: Swedish University Agricultural Science, 1985. p.147-166.
- PURSEL, V.G.; SCHULMAN, L.L.; JOHNSON, L.A. Effect of Orvus es Paste on acrosome morphology, motility and fertilizing capacity of frozen-thawed boar sperm. *Journal of Animal Science*, v.47, n.1, p.198-202, 1978.
- QUESNEL, H.; PRUNIER, A. Endocrine bases of lactational anoestrus in the sow. *Reproduction and Nutritional Development*, v.35, n.4, p.395-414, 1995.
- QUINN, P.J.; CHOW, P.Y.; WHITE, I.G. Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma

- membrane site. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.60, n.2, p.403–407, 1980.
- QUINN, P.J.; SALAMON, S.; WHITE, I.G. The effect of cold shock and freezing of ram spermatozoa collected by electrical ejaculation and by an artificial vagina. *Australian Journal of Agricultural Science*, v.19, n.1, p.119, 1968.
- QUINN, P.J.; WHITE, I.G. The effect of cold shock and deep freezing on the concentration of major cations in spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.12, n.2, p.263, 1966.
- QUINTERO-MORENO, A.; MIRO, J.; RIGAU, T. ET AL Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology*, v.59, n.9, p.1973–1990, 2003.
- RATH, D.; ARMBRECHT, S.; SCHAAP, P. *et al.* Experiences with a computerized videomicrographic system for sperm analysis. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 11., 1988, Dublin. *Proceedings...Dublin, Ireland: University College Dublin, 1988., p.288.*
- REED, H.C.B. Artificial insemination. In: COLE, D.J.A.; FOXCROFT, G.R. *Control of pig reproduction*. London: Butterworths, 1982.
- REED, H.C.B. Current use of frozen boar semen: future need of frozen boar semen. In: 1ST INTERNATIONAL CONFERENCE DEEP FREEZING OF BOAR SEMEN, 1., 1985, Uppsala. *Proceedings...Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences, 1985. p.225–237.*
- 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. *Animal Reproduction Science*, v.43, n.2-3, 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, n.4, p.579-591, 2002.
- 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, n.1, p.77-87, 2003.
- ROCA, J.; HERNÁNDEZ, M.; CARVAJAL, G. *et al.* Factors influencing boar sperm cryosurvival. *Journal of Animal Science*, v.84, n.10, p.2692-2699, 2006.
- ROCA, J.; JUAREZ, J.D.; PARRILLA, I. *et al.* Boar semen can tolerate rapid cooling rates prior to freezing. *Reproduction, Fertility and Development*, v.23, n.5, p.681-690, 2011.
- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? *Reproduction in Domestic Animals*, v.38, n.4, p.312-318, 2003.
- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; EKSTEDT, E.; EINARSSON, S. Acidification of epididymal fluid in the boar. *International Journal of Andrology*, v.13, n.3, p.238-43, 1990.
- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; EKWALL, H.; KVIST, U. *et al.* X-ray microanalysis of boar spermatozoa: changes in the Elemental composition at ejaculation. In: ANNUAL MEETING OF SCANDINAVIAN MICROSCOPY SOCIETY, 1., 1987, Bergen, Norway. *Proceedings... Bergen: Scandinavian Microscopy Society, 1987. p.34.*
- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; KVIST, U.; SARAVIA, F. *et al.* The physiological roles of the boar ejaculate. In: RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; VALLET, J.L.; ZIECIK, A.J. *Control of pig reproduction*. Nottingham: Nottingham University Press, 2009. p.1-21.

- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; OHANIAN, C.; CASTRILLEJO, A. Role of seminal plasma on the sperm decondensation ability of ram semen. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 10., 1984, Urbana-Champaign, Illinois. *Proceedings...* Illinois: ICAR, 1984, p.204.
- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; SARAVIA, F.; WALLGREN, M. *et al.* Boar spermatozoa in the oviduct. *Theriogenology*, v.63, n.2, p.514-35, 2005.
- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; SARAVIA, F.; WALLGREN, M. *et al.* Influence of seminal plasma on the kinematics of boar spermatozoa during freezing. *Theriogenology*, v.70, n.8, p.1242–1250, 2008.
- 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.
- ROJKITTIKHUN, T.; STERNING, M.; RYDHMER, L. *et al.* Oestrous symptoms and plasma levels of oestradiol-17 β in relation to the interval from weaning to oestrus in primiparous sows. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 12., 1992, The Hague. *Proceedings...* The Hague: IPVS, 1992. p.485.
- ROMERO, A.; ROMAO, M.J.; VARELA, P.F. *et al.* The crystal structures of two spermadhesins reveal the CUB domain fold. *Natural Structure Biology*, v.4, n.4, p.783-788, 1997.
- RONER, M.N.B. *Efeito de um sistema de resfriamento e conservação do sêmen suíno a 17°C e 5°C.* 2003. 66f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. MG.
- RONER, M.N.B.; SILVA FILHO, J.M.; PALHARES, M.S. *et al.* Desenvolvimento de um sistema de resfriamento e conservação de sêmen suíno. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.58, n.1, p.78-86, 2006.
- ROPPA, L. Perspectives in world meat production. In: WISEMAN, J.; VARLEY, M.A.; MCORIST, S. *et al.* *Paradigms in pig science*, 1. Nottingham: Nottingham University Press, 2007. p.11-32.
- ROY, A. Storage of boar and stallion spermatozoa in glycine-egg yolk medium. *Veterinary Record*, v.67, p.330, 1955.
- 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. *Journal of Animal Science*, v.75, n.9, p.2323–2327, 1997.
- 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>. Acesso em 10 de Outubro de 2010.
- 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. *Journal of Animal Science*, v.82, n.7, p.2164-2168, 2004.
- ROZEBOOM, K.J.; TROEDSSON, M.; HODSON, H.H. *et al.* The importance of seminal plasma on the fertility of subsequent artificial insemination in swine. *Journal of Animal Science*, v.78, n.2, p.443-448, 2000.
- 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. *Journal of Animal Science*, v.77, n.8, p.2201–2206, 1999.

- 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, *Proceedings...*Nebraska: AASV, 1994. p.1-5.
- RYDHMER, L. Genetics of sow reproduction, including puberty, oestrus, pregnancy, farrowing and lactation. *Livestock Production Science*, v.66, n.1, p.1-12, 2000.
- RYDHMER, L., ELIASSON-SELLING L., JOHANSSON K. *et al.* A genetic study of estrus symptoms at puberty and their relationship to growth and leanness in gilts. *Journal of Animal Science*, v.72, n.8, p.1964-1970, 1994.
- SAACKE, R.G. Sperm morphology: Its relevance to compensable and uncompensable traits in semen. *Theriogenology*, v.70, n.3, .473-478, 2008.
- SAACKE, R.G.; DALTON, J.C.; NADIR, S. *et al.* Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. *Animal Reproduction Science*, v.60-61, n.2, p.663-677, 2000.
- SAACKE, R.G.; NADIR, S.; DALTON, J. *et al.* Accessory sperm evolution and bull fertility and update. *Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction*, v.15, p.57-67, 1994.
- SALISBURY, G.W.; BRATTON, R.W.; FOOTE, R.H. The effect of time and other factors on the non-return to service estimate of fertility level in artificial insemination of cattle. *Journal of Dairy Science*, v.35, n.3, p.256-260, 1952.
- SALISBURY, G.W.; VANDERMARK, N.L.; LODGE, J.R. *Physiology of reproduction and artificial insemination in cattle*. 2.ed. San Francisco: W. H. Freeman & Co. Ltd., 1961. 798p.
- SARAVIA, F. *Cryopreservation of boar semen*. 2008. 63f. Thesis (Doctoral) - Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.
- 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. *International Journal of Andrology*, v.30, n.6, p.485-499, 2007.
- SARAVIA, F.; WALLGREN, M.; JOHANNISSON, A. *et al.* Exposure to the seminal plasma of different portions of the boar ejaculate modulates the survival of spermatozoa cryopreserved in MiniFlatPacks. *Theriogenology*, v.71, n.4, p.662-675, 2009.
- 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. *Animal Reproduction Science*, v.117, n.3-4, p.279-287, 2010.
- 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. *Reproduction in Domestic Animals*, v.43, n.2, p.181, 2008.
- SCHILLING, E.; VENGUST, M. Osmotic pressure of boar semen. *Reproduction in Domestic Animals*, v.21, n.1, 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, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

- SCHNEIDER, L.G.; COSTI, G.; WENTZ, I. Avaliação da mumificação fetal suína em uma granja industrial. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.27, n.4, p.678-683, 2003.
- SELF, H.L. ; R.H. GRUMMER. The rate and economy of pig gains and the reproductive behavior in sows when litters are weaned at 10 days, 21 days, or 56 days of age. *Journal of Animal Science*, v.17, n.3, p.862-868, 1958.
- 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. *Proceedings...* Missouri, 2001.
- SENGER, P.L. *Pathways to pregnancy and parturition*. 2. ed. Washington: Current Conceptions, 2003. 368p
- SERDIUK, S.I. *Artificial insemination of pigs*. Moscow Kolos, 1970. 144p.
- 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. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.98, n.2, p.393-400, 1993a.
- SESTI, L.A.C; BRITT, J.H. Influence of stage of lactation, exogenous luteinizing hormone-releasing hormone and suckling on estrus, positive feedback of luteinizing hormone, and ovulation in sows treated with estrogen. *Journal of Animal Science*, v.71, n.4, p.989-998, 1993b.
- 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. *Biology of Reproduction*, v.50, n.5, p.1078-1086, 1994.
- SEVINE, M.A. Preservation of motility in Bull sperm after thawing from -79°C. *Mighigan Agricultural Experiment Station Quarterly Bulletin*, v.43, p.576, 1961.
- SEXTON, T.J. Research note: influence of damaged spermatozoa on the fertility of turkey semen stored 24 hours at 5°C. *Poultry Science*, v.67, n.10, p.1483-1485, 1988.
- SHANNON, P. Advances in semen dilution. *Proceedings of New Zealand Society for Animal Production*, v.28, p. 23-31, 1968.
- SHANNON, P.; CURSON, B. Toxic effect and action of dead sperm on diluted bovine semen. *Journal of Dairy Science*, v.55, n.5, p. 614-620, 1972.
- SHAW, H.J.; FOXCROFT, G.R. Relationships between LH, FSH and prolactin secretion and reproductive activity in the weaned sow. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.75, n.1, p.17-28, 1985.
- SHIPLEY, C. Breeding soundness examination in the boar. *Swine Health Products*, v.7, n.3, p.117-120, 1999.
- SIGNORET, J.P. The mating behaviour of the sow. In: COLE, D.J.A. (Ed.). *Pig production*. Butterworths, UK, 1971. p. 295-313.
- SILVA FILHO, J.M. *Aspectos do manejo reprodutivo e do sêmen na inseminação artificial de éguas*. 1994. 408f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- 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. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v.38, n.4, p.243-253, 2006.
- SILVA, P.F.N. *Physiology of peroxidation process in mammalian sperm*. 2006. 186f.

Tese (PhD in Animal Science) – Universidade de Utrecht, Holanda.

SILVEIRA, P.R.S.; LAIS, I. *Curso de inseminação artificial em suínos*. Concórdia: EMBRAPA Suínos e Aves, 1999. 20p.

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.

SIQUEIRA, A.P. *Efeito da concentração espermática pré-rediluição e do protocolo de resfriamento do sêmen sobre a viabilidade espermática e fertilidade de fêmeas suínas inseminadas*. 2011. 380f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

SIRVENTE, H.; BEAUMAL, V.; GAILLARD, C. *et al.* Structuring and functionalization of dispersions containing egg yolk, plasma and granules induced by mechanical treatments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.55, n.23, p.9537-9544, 2007.

SLAWETA, R.T.; LASKOWSKA, T.; SZYMANSKA, E. Lipid peroxides, spermatozoa quality and activity of glutathione peroxidase in bull semen. *Acta Physica Polonica*, v.39, n.3, p. 207-214, 1988.

SMITAL, J. Effects influencing boar semen. *Animal Reproduction Science*, v.110, n.3-4, p.335-346, 2009.

SOEDE, N.M.; KEMP, B. Expression of oestrus and timing of ovulation in pigs. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, v.52, p.91-103, 1997.

SOEDE, N.M.; LANGENDIJK, P.; KEMP, B. Reproductive cycles in pigs. *Animal Reproduction Science*, v.124, n.3-4, p.252-258, 2011.

SOEDE, N. M.; NOORDHUIZEN, J.T.P.M.; KEMP, B. The duration of ovulation in pigs, studied by transrectal ultrasonography, is not related to early embryonic diversity. *Theriogenology*, v.38, n.4, p. 653, 1992.

SOEDE, N.M.; STEVERINK, D.W.B.; LANGENDIJK, P. *et al.* Optimized insemination strategies in swine AI. In. BOAR SEMEN PRESERVATION, 4., 2000, Beltsville. *Proceedings...* Beltsville: Allen Press, 2000. p.185-192.

SOEDE, N.M.; WETZELS, C.C.H.; KEMP, B. Oestrus (Standing response for boar and man) and ovulation in sows. *Reproduction in Domestic Animals*, v.31, n.2, p.293-294, 1996.

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. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.105, n.1, p.135-140, 1995b.

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. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.104, n.1, p.99-106, 1995a.

SOEDE, N.M.; LANGENDIJK, P.; KEMP, B. Reproductive cycles in pigs. *Animal Reproduction Science*, v.124, n.3-4, p.251-258, 2011.

SOKOL, R.Z.; SHULMAN, P.; PAULSON, R.J. Comparison of two methods for the measurement of sperm concentration. *Fertility and Sterility*, v.73, n.3, p.591-594, 2000.

SONDERMAN, J.P.; LUEBBE, J.J. Semen production and fertility issues related to differences in genetic lines of boars. *Theriogenology*, v.70, n.8, p.1380-1383, 2008.

- SQUIRES, E.; AMANN, R.P.; MCKINNON, A.O. *et al.* Fertility of equine spermatozoa cooled to 5 or 20°C. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 11., 1988, Dublin, Ireland. *Proceedings...* Dublin: ICAR, 1988. p.297–299.
- STATISTICAL analysis sistem. Versão5 – Microsoft. Cary, North Carolina: SAS Institute Inc., 1999.
- STEN-KNUDSEN, O. *Biological membranes: theory of transport potentials and electric impulses.* Cambridge: Cambridge University Press, 2002. 671p.
- STERNING, M.; RYDHMER, L.; ELIASSON, L. *et al.* A study on primiparous sows of the ability to show standing oestrus and to ovulate after weaning. Influences of loss of body weight and backfat during lactation and of litter size, litter weight gain and season. *Acta Veterinaria Scandinavia*, v.31, n.2, p.227-236, 1990.
- STERNING, M.; RYDHMER, L.; ELIASSON-SELLING, L. Relationships between age at puberty and interval from weaning to estrus and between estrus signs at puberty and after the first weaning in pigs. *Journal of Animal Science*, v.76, n.2, p.353–359, 1998.
- STEVENSON, J.S.; BRITT, J.H. Luteinizing hormone, total estrogens and progesterone secretion during lactation and after weaning in sows. *Theriogenology*, v.14, n.6, 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. *Biology of Reproduction*, v.24, n.2, 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. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.111, n.2, 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. *Journal of Animal Science*, v.77, n.4, p.801-809, 1999.
- STRATMAN, F.W.; SELF, H.L. Effect of semen volume and number of sperm on fertility and embryo survival in artificially inseminated gilts. *Journal of Animal Science*, v.19, n.4, p.1081-1088, 1960.
- STRZEŻEK, J.; KORDA, W.; GLOGOWSKI, J. *et al.* Influence of SemenBcollection Frequency on Sperm Quality in Boars, with special Reference to Biochemical Markers. *Reproduction in Domestic Animals*, v.30, n.2, p.85-94, 1995.
- STRZEZEK, J.; SAIZ-CIDONCHA, F.; WYSOCKI, P. *et al.* Seminal plasma proteins as markers of biological value of boar semen. *Animal Science Papers and Reports*, v.20, n.4, p.255-266, 2002.
- STRZEZEK, J.; WYSOCKI, P.; KORDAN, W. *et al.* Proteomics of boar seminal plasma – current studies and possibility of their application in biotechnology of animal reproduction. *Reproductive Biology*, v.5, n.3, p.279-290, 2005.
- SVAJGR, A.J., HAYS, V.W.; CROMWELL, G.L. *et al.* Effect of lactation duration on reproductive performance of sows. *Journal of Animal Science*, v.38, n.1, p.100-105, 1974.
- SWIERSTRA, E.E. Cytology and duration of the cycle of the seminiferous epithelium of the boar;duration of spermatozoan transit through the epididymis. *Anatomical Record*, v.161, n.2, p.171-186, 1968.
- TAMULI, M.K.; WATSON, P.F. Cold resistance in the live acrosome-intact subpopulation of boar spermatozoa acquired during incubation after ejaculation. *Journal Veterinary Record*, v.135, n.7, 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, n.3, 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, n.3, p.447-459, 1999.
- TEN NAPEL, J.; KEMP, B.; LUITING, P. *et al.* A biological approach to examine genetic variation in weaning-to-oestrus interval in first-litter sows. *Livestock Production Science*, v.41, n.2, p.81-93, 1995.
- TEN NAPEL, J.; MEUWISSEN, T.H.; JOHNSON, R.K. *et al.* Genetics of the interval from weaning to estrus in first-litter sows: correlated responses. *Journal of Animal Science*, v.76, n.4, p.937-947, 1998.
- THÉRIEN, I.; MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Bovine seminal plasma phospholipid-binding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. *Biology of Reproduction*, v.61, n.3, p.590-598, 1999.
- THÉRIEN, I.; MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma and high density lipoproteins induce cholesterol efflux from epididymal sperm. *Biology of Reproduction*, v. 59, n.4, p. 768-776, 1998.
- THURSTON, L.M.; WATSON, P.F.; MILEHAM, A.J. *et al.* Morphologically distinct sperm subpopulations defined by fourier shape descriptors in fresh ejaculates correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation. *Journal of Andrology*, v.22, n.3, p.382-394, 2001.
- TOMLINSON, M.; TURNER, J.; POWELL, G. *et al.* One step disposable chambers for sperm concentration and motility assessment: how do they compare with the world health organizations recommended methods? *Human Reproduction*, v.16, n.1, p.121-124, 2001.
- TONER, M.S.; KING, R.H.; DUNSHEA, F.R. *et al.* The effects of exogenous somatotropin on lactation performance of first-litter sows. *Journal of Animal Science*, v.74, n.1, p.167-172, 1996.
- TÖPFER-PETERSEN, E.; ROMERO, A.; VARELA, P.F. Spermadhesins: a new protein family: facts, hypotheses and perspectives. *Andrologia*, v.30, n.4-5, p.217-224, 1998.
- TREJO, J.A.O. *Efecto del pH de un extensor de semen porcino sobre la calidad espermática*. 2004. 54f. Tesis (Título de Médico Veterinario) - Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- TROEDSSON, M.H.T.; DESVOUSGES, A.; ALGHAMDI, A.S. *et al.* Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. *Animal Reproduction Science*, v.89, n.1-4, p.171-186, 2005.
- TROEDSSON, M.H.T.; LIU, I.K.M.; ING, M.; PASCOE, J. *et al.* Multiple site electromyography recordings of uterine activity following an intrauterine bacterial challenge in mares susceptible and resistant to chronic uterine infection. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.99, n.2, p.307-313, 1993.
- TURNER, R.M. Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. *Reproduction, Fertility and Development*, v.18, n.1-2, p.25-38, 2005.
- VADNAIS, M.L.; KENNETH, P.R. Effects of seminal plasma on coolong-induced capacitate changes in boar sperm. *Journal of Andrology*, v.28, n.1-5, p.416-422, 2007.
- VAN DEN BRAND, H., DIELEMAN, S.J., SOEDE, N.M. *et al.* Dietary energy source at two feeding levels during lactation in

- primiparous sows I Effects on glucose, insulin and LH and on follicle development, weaning-to-estrus interval and ovulation rate. *Journal of Animal Science*, v.78, n.2, p.396-404, 2000.
- 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: Embrapa Suínos e Aves, 2000. p.243-252.
- VAN STRAATEN, H.W.M.; WENSING, C.J.G. Histomorphometric aspects of testicular morphogenesis in pig. *Biology of Reproduction*, v.17, n.4, p.467-472, 1977.
- VARLEY, M.A.; FOXCROFT, G.R. Endocrinology of the lactating and weaned sow. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, v.40, p.47-61, 1990.
- VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L.; LOVE, C.L. *et al.* Effects of cooling rate and storage temperature on equine spermatozoal motility parameters. *Theriogenology*, v.29, n.5, p.1043-1054, 1988
- 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.
- VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L.; MEYERS, J.A. Fertilizing capacity of equine spermatozoa stored for 24 hours at 5°C or 20°C. *Theriogenology*, v.32, n.4, p.515-525, 1989.
- VAZQUEZ, J.L., MARTINEZ, E.A., VAZQUEZ, J.M. *et al.* Development of a non surgical deep intrauterine insemination technique. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BOAR SEMEN PRESERVATION, 4., 1999. Beltsville: *Proceedings...* Beltsville: Allen Press, 1999. p. 35.
- VAZQUEZ, J.M.; ROCA, J.; GIL, M.A. *et al.* Low-Dose Insemination in Pigs: Problems and Possibilities. *Reproduction in Domestic Animals*, v.43, n.2, p.347-354, 2008.
- VENUMANOHARARAO, B.; VENKATAMUNICHETTY, A.; RAMACHANDRAIAH, S.V. *et al.* Preservation of native boar semen. *Indian Journal of Animal Sciences*, v.1, p.37-49, 1991.
- VERSTEGEN J, IGUER-OUADA M, ONELIN K. Computer-assisted semen analysers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, v.57, n.1, p.149-79, 2002.
- VESSEUR, P.C. *Causes and consequences of variation in weaning to oestrus interval.* 1997. 166f. Ph.D Thesis. (Ph. D in Veterinary Medicine – Animal Reproduction) - Research Institute for Pig Husbandry, The Netherlands.
- VESSEUR, P.C.; KEMP, B.; DEN HARTOG, L.A. Factors affecting the weaning to estrus interval in the sow. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, v.72, n.1-5, p.225-233, 1994.
- VESSEUR, P.C.; KEMP, B.; DEN HARTOG, L.A. The effect of the weaning to estrus interval on litter size, live born piglets and farrowing rate in sows. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, v.71, n.1, p.30, 1994.
- VIANA, C.H.C.; CANDINI, P.H.; GAMA, R.D. *et al.* Evaluation of synchronization of ovulation protocol in cyclic sow. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY CONGRESS, 17., 2002, Ames, U.S. *Proceedings...* Ames: IPVS, 2002.
- VIANNA, W.L.; BRUNO, D.G.; NAMINDOME, A. *et al.* Estudo comparativo da eficiência de diferentes técnicas de mensuração da concentração espermática em suínos. *Revista Brasileira*

- de Zootechnia.*, v.33, n.6, p.2054-2059, 2004.
- VIRING, S.; EINARSSON, S. Sperm distribution within the genital tract of naturally inseminated gilts. *Nordisk Veterinaer Medicin*, v.33, n.3, 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. *Animal Reproduction Science*, v.29, n.3, p.185-194, 1992.
- VYT, P. *Examination and storage of liquid porcine semen*. 2007.162f. PhD Thesis (Doctor in Veterinary Science) – Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Ghent.
- VYT, P.; MAES, D.; DEJONCKHEERE, E. *et al.* Comparative study on five different commercial extenders for boar semen. *Reproduction in Domestic Animals*, v.39, n.1, p.8-12, 2004.
- 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. *Animal Reproduction Science*, v.36, n.1-2, p.145-151, 1994a.
- WABERSKI, D.; WEITZE, K.F.; GLEUMES, T. *et al.* Effect of time of insemination relative to ovulation on fertility with liquid and frozen boar semen. *Theriogenology*, v.42, n.5, p.831-840, 1994b.
- 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.
- WALKER, N.; WATT, D.; MACLOUD, A.S. *et al.* The effect of weaning at 10,25 or 40 days on the reproductive performance of sows from the first to the fifth parity. *Journal of Agricultural Science* (Cambridge), v.92, n.2, p.449-456, 1979.
- WALLGREN, M. The importance of temperature for the sperm quality of boar semen AI doses. Uppsala, Sweden: *Universtity of Agriculture*, 1985. (CRB-Reports).
- WALLGREN, M.; SARAVIA, F.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. The vanguard sperm cohort of the boar ejaculate is overrepresented in the tubal sperm reservoir in vivo. *Journal of Reproduction and Development*, v.56, n.1, p.68-72, 2010.
- WALTON, J. S. Effect of boar presence before and after weaning on estrus and ovulation in sows. *Journal of Animal Science*, v.62, n.1, p.9-15, 1986.
- WANG, W. H.; NIWA, K.; OKUDA, K. In vitro penetration of pig oocytes matured in culture by frozen-thawed ejaculated spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.93, n.2, p.491-496, 1991.
- WARNICK, A.C.; CASIDA, L.E.; GRUMMER, R.H. The occurrence of estrus and ovulation in post-partum sows. *Journal of Animal Science*, v.9, n.1, p.66-72, 1950.
- WATSON, P.F. The protection of ram and bull spermatozoa by the low density lipoprotein fraction of egg yolk during storage at 5°C and deep freezing. *Journal of Thermal Biology*, v.1, n.3, p.137-141, 1976.
- WATSON, P.F. Artificial insemination and the preservation of semen. In: LAMMING, G. (Ed.) *Marshall's physiology of reproduction*. 4.ed. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1990. p.747-869.
- WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*, v.7, n.4, p.871-891, 1995.
- WATSON, P.F. The interaction of egg yolk and ram spermatozoa studied with a

- fluorescent probe. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.42, n.1, p.105–111, 1975.
- WATSON, P.F. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 degrees C by egg yolk lipoprotein. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.62, n.2, p.483-492, 1981.
- WATSON, P.F.; BEHAN, J.R. Intrauterine insemination of sows with reduced sperm numbers: results of a commercially based field trial. *Theriogenology*, v.57, n.6, p.1683-1693, 2002.
- 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. *Proceedings...* Uppsala: 1985. p.113-125.
- WEBER, H. *Influence of dilution media, incubation and cooling rate on cold-shock sensitivity of boar spermatozoa*. 1989. 103f. PhD Thesis (Doctor in Veterinary Science) – School of Veterinary Medicine, Hannover University.
- WEITZE, K.F. Long- term storage of extended boar semen. *Reproduction in Domestic Animals*, v.1, suppl., p.23-253, 1990a.
- WEITZE, K.F. Long-term storage of extended boar semen. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 11., 1991, Beltsville. *Proceedings...* Beltsville: IPVS, 1991. p 231-253.
- 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.; HABECK, O.; WILLMEN, T. *et al.* Detection of ovulation in the sows using transcutaneous sonography. *Reproduction in Domestic Animals*, v.24, n.1, p.40-42, 1989.
- WEITZE, K.F.; RATH, D.; WILLMEN, T. *et al.* Advancement of ovulation in the sow related to seminal plasma application before insemination. *Reproduction in Domestic Animals*, v.25, n.2, p.61–67, 1990.
- WEITZE, K.F.; WAGNER-RIETSCHEL, H.; WABERSKI, D. *et al.* The onset of heat after weaning, heat duration and ovulation as major factors in AI timing in sows. *Reproduction in Domestic Animals*, v.91, n.4, p.349-363, 1994.
- WEITZE, K.F.; WEBER, H.; WABERSKI, D. Influence of incubation time and cooling rate on chilling sensitivity of diluted boar semen. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BOAR SEMEN PRESERVATION, 4., 1999, Beltsville, Maryland, USA. *Proceedings...* Lawrence, Allen, 2000. p.264.
- WENTZ, I.; BENNEMANN, P.E.; BORTOLOZZO, F.P. *Inseminação artificial tradicional VS uterina em suínos: é possível implementar?* Porto Alegre: UFRGS, 2006.
- WENTZ, I.; VARGAS, A.; CYPRIANO, C. *et al.* Otimização do manejo reprodutivo de leitoas em granjas com alta performance. In: SIMPÓSIO SOBRE PRODUÇÃO, REPRODUÇÃO E SANIDADE SUÍNA, 1. *Anais...* Disponível em: <<http://www.ufrgs/setorsuinos>>. Acessado em 2011.
- WESTENDORF, P.; RICHTER, L.; TREU, H. Deep freezing of boar sperm. Laboratory and insemination results using the Hulsenberger paillete method. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, v.82, n.7, p.261-267, 1975.
- WHITE, I.G. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reproduction, Fertility and Development*, v.5, n.6, p.639–658, 1993.
- WHITE, I.G. The effect of washing on the motility and metabolism of ram, bull and rabbit spermatozoa. *Journal of*

- Experimental Biology*, v.30, p.200–213, 1953.
- WHITTEMORE, C.T.; FRANKLIN, M.F.; PEARCE, B.S. Fat changes in breeding in sows. *Animal Production*, v.31, n.2, p.183-90, 1980.
- WILLEMSE A.H. ; BOENDER, J. The relation between the time of insemination and fertility in gilts. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde*, v.92, n.1, p.18-34, 1967.
- WILLEMSE, A.H.; BOENDER, J. A quantitative and qualitative analysis of oestrus in gilts. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde*, n.91, p.349-363, 1966.
- WILLIS, H.J.; ZAK, L.J.; FOXCROFT, G.R. Duration of lactation, endocrine and metabolic state, and fertility of primiparous sows. *Journal of Animal Science*, v.81, n.8, p.2088-2102, 2003.
- WILSON, E.R.; JOHNSON, R.K.; WETTEMANN, R.P. Reproductive and testicular characteristics of purebred and crossbred boars. *Journal of Animal Science*, v.44, n.6, p.939, 1977.
- WILSON, M.R.; DEWEY, C.E. The associations between weaning-to-estrus interval and sow efficiency. *Swine Health and Production*, v.1, n.4, p.10-15, 1993.
- WINDSON, D.P.; WHITE, I.G.; SELLEY, M.L. *et al.* Effects of the lipid peroxidation product (E)-4-hydroxy-2-nonenal on ram sperm function. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.99, n.2, p.359-366, 1993.
- WHITTEMORE, C.T. Nutrition reproduction interaction in primiparous sows. *Livestock Production Science*, v.46, n.2, p.65-83, 1996.
- WOELDERS, H. Maintaining quality of boar sperm during storage and transportation. *PIGS - Misset*, v.8, p.22-23, 1992.
- WOELDERS, H. Overview of in methods for evaluation of semen quality. *Reproduction in Domestic Animals*, v.1, suppl.1, p.145-164, 1991.
- 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, n.4, 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. *Journal of Animal Science*, v.76, n.12, p.3079-3089, 1998.
- XUE, J.L.; DIAL, G.D.; MARSH, W.E. *et al.* Influence of lactation length on sow productivity. *Livestock Production Science*, v.34, n.3-4, p. 253-265, 1993.
- XUE, J.L.; DIAL, G.D.; TRIGG, T. *et al.* Influence of mating frequency on sow reproductive performance. *Journal of Animal Science*, v.76, n.12, p.2962-2966, 1998b.
- XUE, J.L.; LUCIA, T.; KOKETSU, Y. *et al.* Effect of mating frequency and weaning-to-mating interval on sow reproductive performance. *Swine Health and Production*, v.6, n.4, p.157-162, 1998a.
- YAMAKAWA, K.; YOSHIDA, K.; NISHIKAWA, H. *et al.* Comparative analysis of interindividual variations in the seminal plasma proteome of fertile men with identification of potential markers for azoospermia in infertile patients. *Journal of Andrology*, v.28, n.6, p. 858–865, 2007.
- 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. *Biology of Reproduction*, v.59, n.1, p.202-207, 1998.
- YESTE, M.; BRIZ, M.; PINART, E. *et al.* Boar spermatozoa and prostaglandin F2 α : Quality of boar sperm after the addition of prostaglandin F2 α to the short-term extender over cooling time. *Animal*

Reproduction Science, v.108, n.1-2, p.180–195, 2008a.

YI, Y.J.; IM, G.S.; PARK, C.S. Lactose egg-yolk diluents supplemented with Nacetil Dglucosamine affect acrosome morphology and motility of frozen thawed boar sperm. *Animal Reproduction Science*, v.74, n.3-4, p.187-194, 2002.

ZAIN, A.E., NAKAO, T.; RAOUF, M.A. *et al.* Factors in resumption of ovarian activity and uterine involution in postpartum dairy cows. *Animal Reproduction Science*, v.38, p.203-214, 1995.

ZAK, L.J.; PATTERSON, J.; HANCOCK, J. *et al.* Benefits of synchronizing ovulation with porcine luteinizing hormone in a fixed-

time insemination protocol in weaned multiparous sows. *Journal of Swine Health Production*, v.18, n.3, p.125–131, 2010.

ZEUNER, A. On the relations between sperm morphology and the fertility of boar semen. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION, 12., 1992, The Hague. *Proceedings...The Netherlands: ICAR*, 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, n.9, p.1443-1452, 2000.

8. FICHAS USADAS

8.1. Ficha de coleta e avaliação do sêmen

Projeto Transporte										
Dia:										
Experimento:			0H			12H		0h Pos-Red.	24H	
Machos:	M1	M2		T1	T2	T1	T2	T1	T1	T2
Motilidade:			Mot. Frio:							
Vigor:			Vigor Frio:							
Cor/Aspecto:			10':							
Volume F1:										
Concentração				36H						
Horário Coleta:			Mot. Frio:	T1	T2					
Horário Resfriamento:				Vigor Frio:						
Holding-Time:				10':						

8.4: Ficha de acompanhamento dos partos

N° da porca:	Data do parto:
Nascidos Totais:	Nascidos vivos:
Natimortos:	Mumificados:
Início do parto:	Final do parto:
Duração da gestação:	
Observações:	

N° da porca:	Data do parto:
Nascidos Totais:	Nascidos vivos:
Natimortos:	Mumificados:
Início do parto:	Final do parto:
Duração da gestação:	
Observações:	

N° da porca:	Data do parto:
Nascidos Totais:	Nascidos vivos:
Natimortos:	Mumificados:
Início do parto:	Final do parto:
Duração da gestação:	
Observações:	

9. FIGURAS:

FIGURA 2 - Coleta fracionada de sêmen no tubo falcon



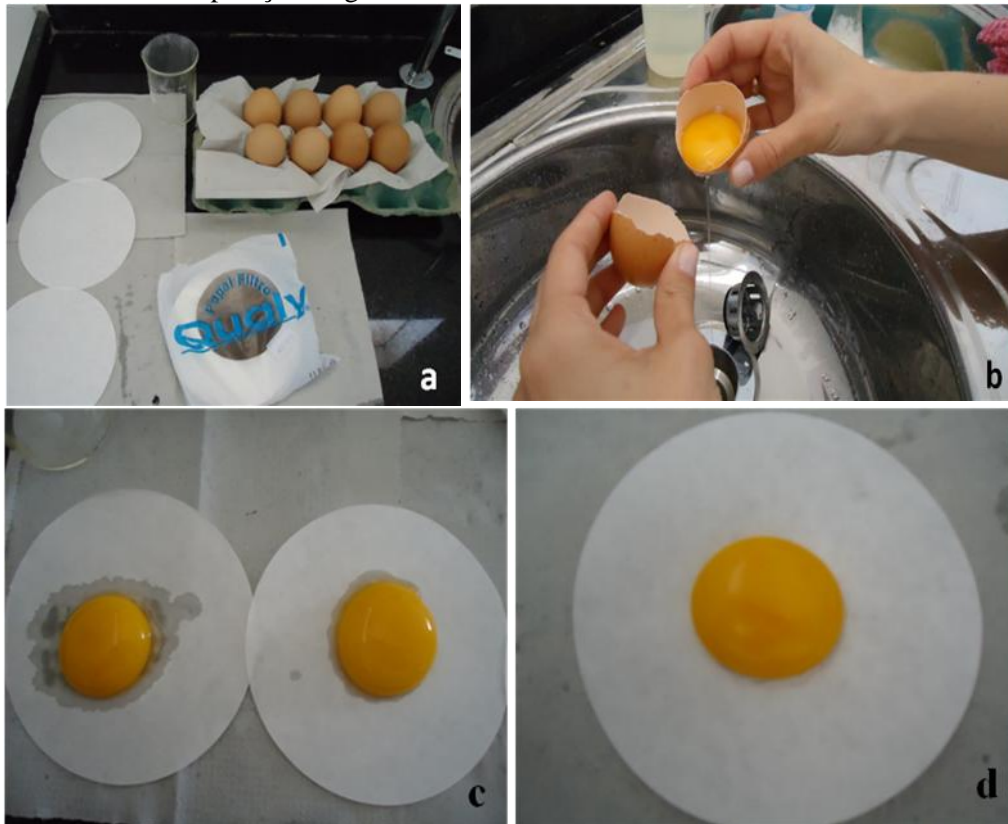
Fonte: Alkmin (2010)

FIGURA 3 - Preparação do diluidor

FIGURA 3.1. - Água utilizada para a preparação do diluidor em erlenmeyer e termômetro para conferência da temperatura



FIGURA 3.2 - Separação da gema



Legenda: a. Ovos limpos e secos e filtros de papel para a disposição e separação da gema; b. Ovo quebrado para a retirada inicial da clara previamente à disposição da gema no papel filtro; c. gemas dispostas no filtro para a retirada da clara, d. gema sem clara, pronta para ser utilizada.

FIGURA 3.3. - Eversão da gema separada da clara no béquer

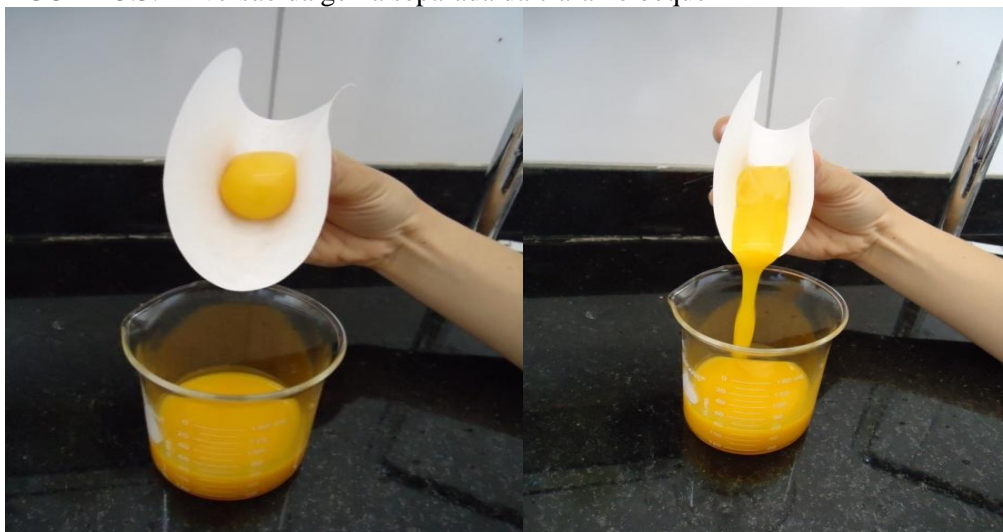
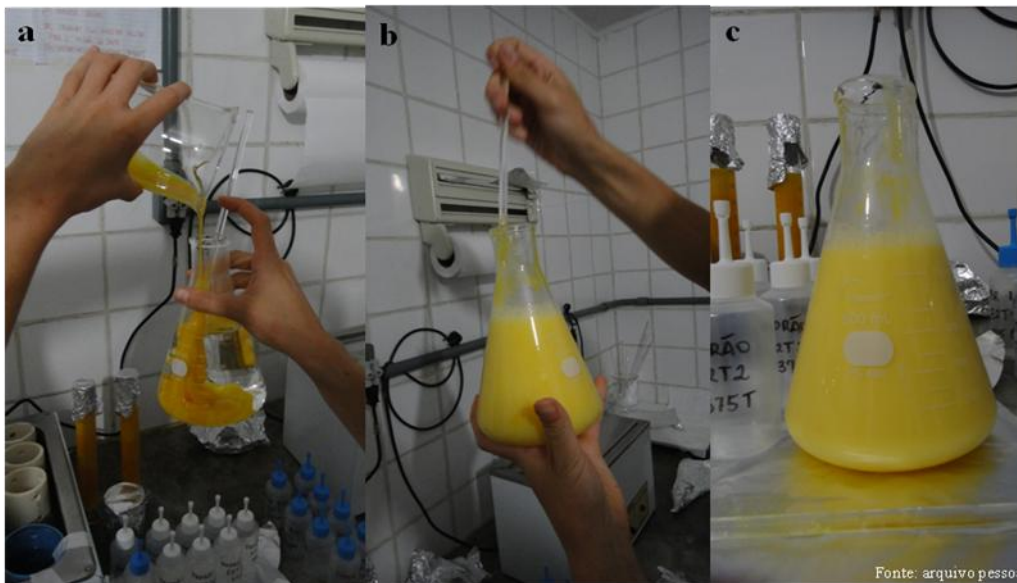


FIGURA 3.4. - Solução inicial do diluidor GGO pronta e provetas contendo a gema separada



FIGURA 3.5. - Adição da gema de ovo à solução inicial do diluidor e homogeneização com bastão de vidro



Legenda: a. gema de ovo sendo adicionada à solução inicial; b. homogeneização da gema de ovo com o bastão de vidro; c. diluidor pronto.

FIGURA 4. - Diluição do sêmen:

FIGURA 4.1. - Bisnagas contendo o diluidor no banho maria previamente preparado para as coletas e processamento do sêmen

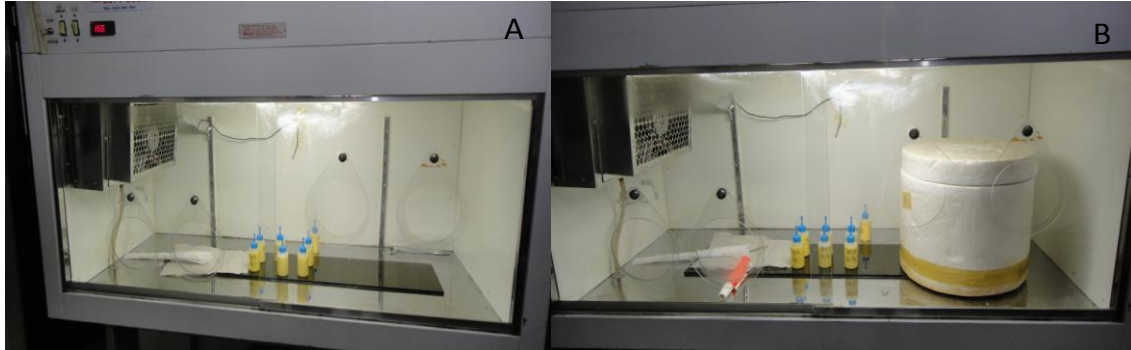


Figura 4.2. - Diluição do sêmen



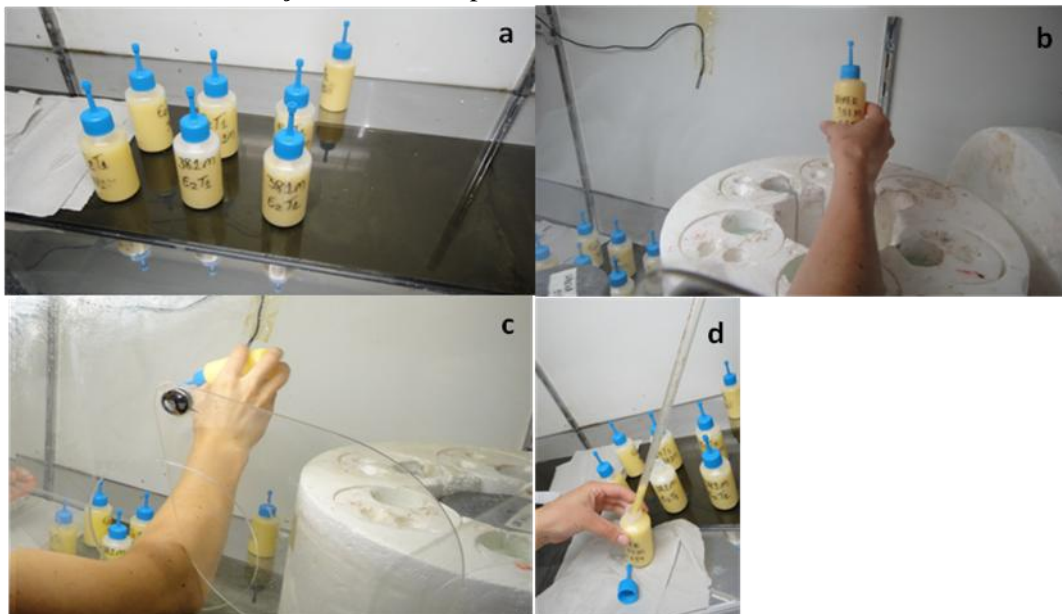
FIGURA 5. - Rediluição de sêmen:

FIGURA 5.1. - Balcão refrigerador utilizado para a rediluição do sêmen



Legenda: A) bisnagas contendo o diluidor GGO (Foote, 2002) colocadas no interior do balcão refrigerador, onde eram mantidas até que a sua temperatura chegasse a 5°C; B) contêiner contendo a dose hiperconcentrada para rediluição dentro do balcão refrigerador.

FIGURA 5.2. - Rediluição do sêmen hiperconcentrado



Legenda: a. bisnagas com diluidor no balcão refrigerador pré-rediluição; b. dose hiperconcentrada sendo retirada do contêiner dentro do balcão; c. homogeneização inicial da dose hiperconcentrada; d. rediluição.

FIGURA 6. - Procedimentos relacionados às fêmeas

FIGURA 6.1. - Fêmeas selecionadas marcadas na gestação



FIGURA 6.2. Fêmeas prontas para as inseminações



FIGURA 6.3. - Fêmea sendo inseminada



10. ANEXOS - TABELAS DE ANÁLISES ESTATÍSTICAS:

I. Análises estatísticas referentes ao Experimento I

Ia – Análises estatísticas referentes à tabela 15

Análise 1. Distribuição da utilização dos machos entre os tratamentos no experimento I

Tratamentos	Machos									Total
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
T1	2	1	2	1	1	1	1	1	1	11
T2	2	1	2	1	1	1	1	1	1	11
Total	4	2	4	2	2	2	2	2	2	22

Teste Estatístico	Valor	GL	P>
Qui - Quadrado	0,000	8	1,000

Análise 2. Comparação da motilidade espermática entre os tratamentos de acordo com o momento (arsen V%)

Análise de Variância					
Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	p
Modelo	10	0,3553	0,0355	9,23	0,0001
Erro	102	0,3925	0,0038		
Total	112	0,7478			

Coefficiente de variação: 5,8167

Teste estatístico	Agrupamento pelo Teste					
	Fresco	0H	12h	Rediluído	24h	36 h
SNK (p<0,05)	a	a	b	b	b	b

Análise 3. Comparação da motilidade espermática entre os tratamentos nos diferentes momentos de avaliação no experimento I

Tratamento x Momento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p
T1 Fresco	11	68,0909	96,0015	749,0000	627,0	
T1 0h	11	81,6818	96,0015	898,5000	627,0	
T1 12h	11	68,5455	96,0015	754,0000	627,0	
T1 Rediluído	11	57,6364	96,0015	634,0000	627,0	
T1 24h	11	51,6364	96,0015	568,0000	627,0	0,0022
T1 36h	7	37,5000	78,0699	262,5000	399,0	
T2 Fresco	11	68,0909	96,0015	749,0000	627,0	
T2 0h	11	53,1818	96,0015	585,0000	627,0	
T2 12h	11	60,3182	96,0015	663,5000	627,0	
T2 24h	11	34,3636	96,0015	378,0000	627,0	
T2 36h	7	28,5000	78,0699	199,5000	399,0	

Análise 4. Avaliação da motilidade espermática independentemente do tratamento de acordo com o momento de avaliação no experimento I

Motilidade			
Momento	Média	EP	p > T
0h	81,3636	1,0436	0,0001
12h	74,3181	1,0436	0,0001
24h	72,0454	1,0436	0,0001
36h	70,7142	1,3082	0,0001
Fresco	82,2727	1,0436	0,0001
Rediluído	73,7344	1,5534	0,0001

Ib. Análises estatísticas referentes à tabela 16

Análise 5. Comparação do vigor espermático entre os tratamentos nos diferentes momentos de avaliação no experimento I

Tratamento x Momento	N	Média	EP	Sum Sco.	Expected	p
T1 Fresco	11	68,0909	96,0015	749,0000	627,0	
T1 0h	11	81,6818	96,0015	898,5000	627,0	
T1 12h	11	68,5455	96,0015	754,0000	627,0	
T1 Rediluído	11	57,6364	96,0015	634,0000	627,0	
T1 24h	11	51,6364	96,0015	568,0000	627,0	0,0022
T1 36h	7	37,5000	78,0699	262,5000	399,0	
T2 Fresco	11	68,0909	96,0015	749,0000	627,0	
T2 0h	11	53,1818	96,0015	585,0000	627,0	
T2 12h	11	60,3182	96,0015	663,5000	627,0	
T2 24h	11	34,3636	96,0015	378,0000	627,0	
T2 36h	7	28,5000	78,0699	199,5000	399,0	

Análise 6. Comparação do vigor espermático independentemente do tratamento nos diferentes momentos de avaliação no experimento I

Vigor			
Momento	Média	EP	p > T
0h	3,4773	0,1052	0,0001
12h	3,4318	0,1052	0,0001
24h	3,0682	0,1052	0,0001
36h	2,8571	0,1319	0,0001
Fresco	3,4545	0,1052	0,0001
Rediluído	3,1956	0,1566	0,0001

Análise 7. Comparação do vigor espermático entre o tempo 0 hora e o sêmen fresco dentro do tratamento 1 (Teste Wilcoxon)

Momento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p>Z
0 hora	11	12,9545	13,5062	142,5000	126,5000	0,2511
Fresco	11	10,0455	13,5062	110,5000	126,5000	

Análise 8. Comparação do vigor espermático entre o tempo 0 hora e o tempo 12 horas dentro do tratamento 1 (Teste Wilcoxon)

Momento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p>Z
0 hora	11	12,9091	13,5013	142,0	126,5000	0,2666
12 hora	11	10,0909	13,5013	111,0	126,5000	

Análise 9. Comparação do vigor espermático entre o tempo 0 horas e o sêmen rediluído dentro do tratamento 1 (Teste Wilcoxon)

Momento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p>Z
0 hora	11	13,9091	14,0666	153,0	126,5000	0,0646
Rediluído	11	9,0909	14,0666	100,0	126,5000	

Análise 10. Comparação do vigor espermático entre o tempo 0 hora e o tempo 24 horas dentro do tratamento 1 (Teste Wilcoxon)

Momento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p>Z
0 hora	11	14,4091	13,9450	158,5000	126,5000	0,0239
24 horas	11	8,5909	13,9450	94,5000	126,5000	

Análise 11. Comparação do vigor espermático entre o tempo 0 horas e o tempo 36 horas dentro do tratamento 1 (Teste Wilcoxon)

Momento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p>Z
0 hora	11	12,0455	10,0389	132,5000	104,5000	0,0062
36 horas	7	5,5000	10,0389	38,5000	66,5000	

Análise 12. Comparação do vigor espermático entre o tempo 12 horas e o sêmen a fresco dentro do tratamento 1 (Teste Wilcoxon)

Momento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p>Z
12 horas	11	11,5455	14,2974	127,0	126,5000	1,0000
Fresco	11	11,5455	14,2974	126,0	126,5000	

Análise 13. Comparação do vigor espermático entre o tempo 12 horas e o sêmen rediluído dentro do tratamento 1 (Teste Wilcoxon)

Momento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p>Z
12 horas	11	12,5909	14,4387	138,5000	126,5000	0,4258
Rediluído	11	10,4091	14,4387	114,5000	126,5000	

Análise 14. Comparação do vigor espermático entre o tempo 12 horas e o tempo 24 horas dentro do tratamento 1 (Teste Wilcoxon)

Momento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p>Z
12 horas	11	13,1818	13,9732	145,0	126,5000	0,1977
24 horas	11	9,8182	13,9732	108,0	126,5000	

Análise 15. Comparação do vigor espermático entre o tempo 12 horas e o tempo 36 horas dentro do tratamento 1 (Teste Wilcoxon)

Momento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p>Z
12 horas	11	11,4091	9,9255	125,5000	104,5000	0,0389
36 horas	7	6,5000	9,9255	45,5000	66,5000	

Análise 16. Comparação do vigor espermático entre o sêmen a fresco e o rediluído dentro do tratamento 1 (Teste Wilcoxon)

Momento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p>Z
Fresco	11	12,5455	14,4432	138,0	126,5000	0,4463
Rediluído	11	10,4545	14,4432	115,0	126,5000	

Análise 17. Comparação do vigor espermático entre o tempo 24 horas e o sêmen a fresco dentro do tratamento 1 (Teste Wilcoxon)

Momento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p>Z
24 horas	11	9,8182	13,9732	108,0	126,5000	0,1977
Fresco	11	13,1818	13,9732	145,0	126,5000	

Análise 18. Comparação do vigor espermático entre o tempo 36 horas e o sêmen a fresco dentro do tratamento 1 (Teste Wilcoxon)

Momento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p>Z
36 horas	7	6,5000	9,9255	45,5000	66,5000	0,0389
Fresco	11	11,4091	9,9255	125,5000	104,5000	

Análise 19. Comparação do vigor espermático entre o tempo 24 horas e o sêmen rediluído dentro do tratamento 1 (Teste Wilcoxon)

Momento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p>Z
24 horas	11	10,9091	13,4576	120,0	126,5000	0,6557
Rediluído	11	12,0909	13,4576	133,0	126,5000	

Análise 20 . Comparação do vigor espermático entre o tempo 36 horas e o sêmen rediluído dentro do tratamento 1 (Teste Wilcoxon)

Momento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p>Z
36 horas	7	7,5000	9,2360	52,5000	66,5000	0,1438
Rediluído	11	10,7727	9,2360	118,5000	104,5000	

Análise 21. Comparação do vigor espermático entre o tempo 24 horas e o tempo 36 horas dentro do tratamento 1 (Teste Wilcoxon)

Momento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p>Z
24 horas	11	10,4545	7,1647	115,0	104,5000	0,1628
36 horas	7	8,0000	7,1647	56,0	66,5000	

Análise 22. Comparação do vigor espermático entre o tempo 0 horas e o sêmen a fresco dentro do tratamento 2 (Teste Wilcoxon)

Momento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p>Z
0 hora	11	9,8182	14,5516	108,0	126,5000	0,2161
Fresco	11	13,1818	14,5516	145,0	126,5000	

Análise 23. Comparação do vigor espermático entre o tempo 12 horas e o sêmen a fresco dentro do tratamento 2 (Teste Wilcoxon)

Momento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p>Z
12 horas	11	10,5909	14,2791	116,5000	126,5000	0,5059
Fresco	11	12,4091	14,2791	136,5000	126,5000	

Análise 24. Comparação do vigor espermático entre o tempo 24 horas e o sêmen a fresco dentro do tratamento 2 (Teste Wilcoxon)

Momento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p>Z
24 horas	11	8,3182	13,4673	91,5000	126,5000	0,0104
Fresco	11	14,6818	13,4673	161,5000	126,5000	

Análise 25. Comparação do vigor espermático entre o tempo 36 horas e o sêmen a fresco dentro do tratamento 2 (Teste Wilcoxon)

Momento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p>Z
36 horas	7	6,0714	10,6766	42,5000	66,5000	0,0277
Fresco	11	11,6818	10,6766	128,5000	104,5000	

Análise 26. Comparação do vigor espermático entre o tempo 0 horas e o tempo 12 horas dentro do tratamento 2 (Teste Wilcoxon)

Momento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p>Z
0 horas	11	10,7727	14,0433	118,5000	126,5000	0,5933
12 horas	11	12,2273	14,0433	134,5000	126,5000	

Análise 27. Comparação do vigor espermático entre o tempo 12 horas e o tempo 24 horas dentro do tratamento 2 (Teste Wilcoxon)

Momento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p>Z
12 horas	11	14,2727	11,9254	157,0	126,5000	0,0119
24 horas	11	8,7273	11,9254	96,0	126,5000	

Análise 28. Comparação do vigor espermático entre o tempo 12 horas e o tempo 36 horas dentro do tratamento 2 (Teste Wilcoxon)

Momento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p>Z
12 horas	11	11,5455	10,2804	127,0	104,5000	0,0324
36 horas	7	6,2857	10,2804	44,0	66,5000	

Análise 29. Comparação do vigor espermático entre o tempo 0 hora e o tempo 24 horas dentro do tratamento 2 (Teste Wilcoxon)

Momento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p>Z
0 horas	11	13,8182	12,5409	152,0	126,5000	0,0462
24 horas	11	9,1818	12,5409	101,0	126,5000	

Análise 30. Comparação do vigor espermático entre o tempo 0 hora e o tempo 36 horas dentro do tratamento 2 (Teste Wilcoxon)

Momento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p>Z
0 horas	11	11,2727	10,4202	124,0	104,5000	0,0682
36 horas	7	6,7143	10,4202	47,0	66,5000	

Análise 31. Comparação do vigor espermático entre o tempo 24 horas e o tempo 36 horas dentro do tratamento 2 (Teste Wilcoxon)

Momento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p>Z
24 horas	11	10,1818	8,6957	112,0	104,5000	0,4208
36 horas	7	8,4286	8,6957	59,0	66,5000	

Análise 32. Comparação do vigor espermático entre os tratamentos para o sêmen a fresco no experimento I (Teste Wilcoxon)

Momento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p>Z
Fresco T1	11	11,5000	14,2929	126,5000	126,5000	1,0000
Fresco T2	11	11,5000	14,2929	126,5000	126,5000	

Análise 33. Comparação do vigor espermático entre os tratamentos para o sêmen no tempo 0 hora no experimento I (Teste Wilcoxon)

Momento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p>Z
0 horas T1	11	14,7273	14,4523	162,0	126,5000	0,0154
0 horas T2	11	8,2727	14,4523	91,0	126,5000	

Análise 34. Comparação do vigor espermático entre os tratamentos para o sêmen no tempo 12 horas no experimento I (Teste Wilcoxon)

Momento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p>Z
12 horas T1	11	12,4091	14,2791	136,5000	126,5000	0,5059
12 horas T2	11	10,5909	14,2791	116,5000	126,5000	

Análise 35. Comparação do vigor espermático entre os tratamentos para o sêmen no tempo 24 horas no experimento I (Teste Wilcoxon)

Momento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p>Z
24 horas T1	11	13,3636	10,2417	147,0	126,5000	0,0508
24 horas T2	11	9,6364	10,2417	106,0	126,5000	

Análise 36. Comparação do vigor espermático entre os tratamentos para o sêmen no tempo 36 horas no experimento I (Teste Wilcoxon)

Momento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p>Z
36 horas T1	7	8,5000	6,2373	59,5000	52,5000	0,2974
36 horas T2	7	6,5000	6,2373	45,5000	52,5000	

Ic. Análises estatísticas referentes à tabela 17

Análise 37. Comparação da motilidade espermática entre os tratamentos no experimento I (teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
T1	11	82,2727	6,4667	1,9498	Desigual	0,0000	20,0	1,0000
T2	11	82,2727	6,4667	1,9498	Igual	0,0000	20,0	1,0000
Para Ho: Variâncias são iguais, F²= 1,00					DF= 10,10	Prob>F' = 1,0000		

Análise 38. Comparação da motilidade espermática transformada (arcsen V%) entre os tratamentos no experimento I (teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
T1	11	1,1418	0,0854	0,0257	Desigual	0,0000	20,0	1,0000
T2	11	1,1418	0,0854	0,0257	Igual	0,0000	20,0	1,0000
Para Ho: Variâncias são iguais, F²= 1,00					DF= 10,10	Prob>F' = 1,0000		

Análise 39. Comparação do número de espermatozoides totais ($\times 10^6$) por mL da P1 entre os tratamentos no experimento I

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
T1	11	647,7272	99,9716	30,1426	Desigual	0,0000	20,0	1,0000
T2	11	647,7272	99,9716	30,1426	Igual	0,0000	20,0	1,0000
Para Ho: Variâncias são iguais, F²= 1,00					DF= 10,10	Prob>F' = 1,0000		

Análise 40. Comparação do número de espermatozoides móveis ($\times 10^6$) por mL da P1 entre os tratamentos no experimento I

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
T1	11	533,5318	97,3224	29,3438	Desigual	0,0000	20	1,0000
T2	11	533,5318	97,3224	29,3438	Igual	0,0000	20	1,0000
Para Ho: Variâncias são iguais, F²= 1,00					DF= 10,10	Prob>F' = 1,0000		

Análise 41. Comparação do número de espermatozoides totais ($\times 10^9$) da P1 entre os tratamentos no experimento I

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
T1	11	38,8636	5,9983	1,8086	Desigual	0,0000	20	1,0000
T2	11	38,8636	5,9983	1,8086	Igual	0,0000	20	1,0000
Para Ho: Variâncias são iguais, F²= 1,00					DF= 10,10	Prob>F' = 1,0000		

Análise 42. Comparação do número de espermatozoides móveis ($\times 10^9$) da P1 entre os tratamentos no experimento I

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
T1	11	32,0147	5,8387	1,7604	Desigual	0,0000	20	1,0000
T2	11	32,0147	5,8387	1,7604	Igual	0,0000	20	1,0000
Para Ho: Variâncias são iguais, F²= 1,10					DF= 10,10	Prob>F' = 1,0000		

Análise 43. Comparação do volume de sêmen entre os tratamentos no experimento I

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
T1	11	14,4782	2,7078	0,8164	Desigual	13,9416	10,7	0,0001
T2	11	2,8909	0,5161	0,1556	Igual	13,9416	20,0	0,0000
Para Ho: Variâncias são iguais, F²= 27,52					DF= 10,10	Prob>F' = 0,0000		

Análise 44. Comparação do volume de diluidor entre os tratamentos no experimento I

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
T1	11	14,4782	2,7078	0,8164	Desigual	13,9416	10,7	0,0001
T2	11	2,8909	0,5161	0,1556	Igual	13,9416	20,0	0,0000
Para Ho: Variâncias são iguais, F²= 27,52					DF= 10,10	Prob>F² = 0,0000		

Análise 45. Comparação do número de espermatozoides totais por dose entre os tratamentos no experimento I

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
T1	11	18,3109	1,5561	0,4692	Desigual	30,6799	10,7	0,0001
T2	11	3,6615	0,2944	0,0888	Igual	30,6799	20,0	0,0000
Para Ho: Variâncias são iguais, F²= 27,94					DF= 10,10	Prob>F² = 0,0000		

Análise 46. Comparação do número de espermatozoides móveis por dose entre os tratamentos no experimento I

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
T1	11	14,9764	0,1742	0,0525	Desigual	219,4264	11,6	0,0001
T2	11	2,9916	0,0497	0,0150	Igual	219,4264	20,0	0,0000
Para Ho: Variâncias são iguais, F²= 12,29					DF= 10,10	Prob>F² = 0,0005		

Análise 47. Comparação do número de doses produzidas entre tratamentos no experimento I

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
T1	11	5,0000	0,06	0,06	Desigual	-0,6489	10,0	0,5310
T2	11	5,3636	1,8586	5,6040	Igual	-0,6489	20,0	0,5238
Obs.: Todos os valores são os mesmos para uma mesma classe								

Análise 48. Comparação do número real de fêmeas inseminadas entre tratamentos no experimento I

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
T1	11	2,6364	1,1201	0,3377	Desigual	-0,1779	19,7	0,8606
T2	11	2,7272	1,2721	0,3835	Igual	-0,1779	20,0	0,8606
Para Ho: Variâncias são iguais, F²= 1,29					DF= 10,10	Prob>F² = 0,6950		

Id. Análises estatísticas referentes à tabela 18

Análise 49. Comparação do número total de inseminações entre os tratamentos no experimento I (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
T1	10	3,9000	0,3162	0,1000	Desigual	1,5667	14,9	0,1382
T2	10	3,6000	0,5164	0,1633	Igual	1,5667	18,0	0,1346
Para Ho: Variâncias são iguais, F²= 2,67					DF= 9,9	Prob>F² = 0,1601		

Análise 50. Comparação do intervalo da coleta de sêmen à primeira inseminação artificial entre os tratamentos no experimento I

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
T1	10	24,5210	9,3266	2,9493	Desigual	0,9553	17,6	0,3524
T2	10	20,2170	10,7712	3,4061	Igual	0,9553	18,0	0,3521
Para Ho: Variâncias são iguais, F²= 1,33					DF= 9,9 Prob>F² = 0,6749			

Análise 51. Comparação do intervalo do início do cio à primeira inseminação entre os tratamentos no experimento I

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
T1	10	12,9780	3,7545	1,1873	Desigual	1,3445	15,7	0,1979
T2	10	11,0570	2,5135	0,7948	Igual	1,3445	18,0	0,1955
Para Ho: Variâncias são iguais, F²= 2,23					DF= 9,9 Prob>F² = 0,2476			

Análise 52. Comparação da motilidade espermática entre os tratamentos na primeira inseminação no experimento I

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
T1	10	75,0000	3,3333	1,0541	Desigual	-0,3612	17,6	0,7223
T2	10	75,0000	2,8382	0,8975	Igual	-0,3612	18,0	0,7222
Para Ho: Variâncias são iguais, F²= 1,38					DF= 9,9 Prob>F² = 0,6396			

Análise 53. Comparação da motilidade espermática transformada (arcsen V%) entre os tratamentos na primeira inseminação no experimento I

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
T1	10	1,0480	0,0386	0,0122	Desigual	-0,3477	17,6	0,7322
T2	10	1,0536	0,0332	0,0105	Igual	-0,3477	18,0	0,7321
Para Ho: Variâncias são iguais, F²= 1,36					DF= 9,9 Prob>F² = 0,6566			

Análise 54. Comparação da duração da primeira inseminação entre os tratamentos no experimento I

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
T1	10	18,6000	7,7057	2,4368	Desigual	-0,7842	17,7	0,4433
T2	10	21,5000	8,7971	2,7819	Igual	-0,7842	18,0	0,4431
Para Ho: Variâncias são iguais, F²= 1,30					DF= 9,9 Prob>F² = 0,6995			

Análise 55. Intervalos da coleta de sêmen à rediluição e da rediluição à primeira inseminação no experimento I

Variável	N	Média	EP	Minímo	Máximo	CV
Coleta-Redil.	10	10,4540	0,2187	9,7500	11,4200	6,6152
Redil.-IA	10	14,0670	3,0501	0,9200	24,2800	68,5671

Análise 56. Distribuição da utilização das duplas de machos entre os tratamentos na primeira inseminação no experimento I

Machos					
Tratamentos	1	2	5	6	Total
T1	6	0	2	2	10
T2	4	1	3	2	10
Total	10	1	5	4	20

Análise 57. Comparação do vigor espermático entre os tratamentos na primeira inseminação

Tratamento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p
T1	10	12,5000	12,0743	125,0	105,0	0,1063
T2	10	8,5000	12,0743	85,0	105,0	

Análise 58. Comparação do intervalo da coleta do sêmen à segunda inseminação entre os tratamentos no experimento I

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
T1	10	20,4290	7,1030	2,2462	Desigual	-2,3217	12,6	0,0377
T2	10	26,1640	3,2504	1,0279	Igual	-2,3217	18,0	0,0322
Para Ho: Variâncias são iguais, F² = 4,78				DF = 9,9		Prob>F' = 0,0291		

Análise 59. Comparação do intervalo do início do cio à segunda inseminação entre os tratamentos no experimento I

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
T1	10	25,4750	1,0370	0,3279	Desigual	-0,3749	18	0,7121
T2	10	25,6500	1,0507	0,3323	Igual	-0,3749	18	0,7121
Para Ho: Variâncias são iguais, F² = 1,03				DF = 9,9		Prob>F' = 0,9694		

Análise 60. Comparação do intervalo entre a primeira e a segunda inseminações entre os tratamentos no experimento I

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
T1	10	12,3010	3,1940	1,0100	Desigual	-1,8095	17,2	0,0879
T2	10	14,6460	2,5677	0,8120	Igual	-1,8095	18,0	0,0871
Para Ho: Variâncias são iguais, F² = 1,55				DF = 9,9		Prob>F' = 0,5258		

Análise 61. Comparação da motilidade espermática entre os tratamentos na segunda inseminação no experimento I

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
T1	10	75,0000	3,3333	1,0541	Desigual	0,3180	17,8	0,7542
T2	10	74,5000	3,6893	1,1667	Igual	0,3180	18,0	0,7541
Para Ho: Variâncias são iguais, F² = 1,23				DF = 9,9		Prob>F' = 0,7674		

Análise 62. Comparação da motilidade espermática transformada (arcsen V%) entre os tratamentos na segunda inseminação no experimento I

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
T1	10	1,0480	0,0386	0,0122	Desigual	0,3078	17,8	0,7618
T2	10	1,0423	0,0426	0,0134	Igual	0,3078	18,0	0,7618
Para Ho: Variâncias são iguais, F² = 1,22				DF = 9,9		Prob>F' = 0,7751		

Análise 63. Comparação da duração da segunda inseminação entre os tratamentos no experimento I

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
T1	10	18,4000	8,1677	2,5828	Desigual	-1,1898	13,9	0,2540
T2	10	24,8000	14,9205	4,7183	Igual	-1,1898	18,0	0,2596
Para Ho: Variâncias são iguais, F²= 3,34					DF= 9,9	Prob>F' = 0,0872		

Análise 64. Intervalos da coleta de sêmen à rediluição e da rediluição do sêmen à segunda inseminação no experimento I

Variável	N	Média	EP	Minímo	Máximo	CV
Coleta-Redil.	10	10,8420	0,0871	10,4200	11,4200	2,5400
Redil.-IA	10	9,5870	2,2961	0,8400	16,1300	75,7365

Análise 65. Distribuição da utilização das duplas de machos entre os tratamentos na segunda inseminação no experimento I

Tratamento	Machos							Total
	1	2	3	4	5	6	7	
T1	2	4	2	0	1	1	0	10
T2	2	2	0	1	0	4	1	10
Total	4	6	2	1	1	5	1	20

Análise 66. Comparação do vigor espermático entre os tratamentos na segunda inseminação no experimento I (Teste Wilcoxon)

Tratamento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p>Z
T1	10	13,1000	10,6992	131,0	105,0	0,0172
T2	10	7,9000	10,6992	79,0	105,0	

Análise 67. Comparação do intervalo da coleta do sêmen à terceira inseminação entre os tratamentos no experimento I (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
T1	10	20,2770	8,1496	2,5771	Desigual	-1,1838	17,5	0,2523
T2	10	24,2800	6,9229	2,1892	Igual	-1,1838	18,0	0,2519
Para Ho: Variâncias são iguais, F²= 1,39					DF= 9,9	Prob>F' = 0,6348		

Análise 68. Comparação do intervalo do início do cio à terceira inseminação entre os tratamentos no experimento I (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
T1	10	35,9860	3,2043	1,0133	Desigual	0,8626	14,6	0,4023
T2	10	34,9710	1,8917	0,5982	Igual	0,8626	18,0	0,3997
Para Ho: Variâncias são iguais, F²= 2,87					DF= 9,9	Prob>F' = 0,1323		

Análise 69. Comparação do intervalo entre a segunda e a terceira inseminações entre os tratamentos no experimento I (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
T1	10	11,6110	2,4585	0,7774	Desigual	2,4178	17,7	0,0267
T2	10	9,1190	2,1399	0,6767	Igual	2,4178	18,0	0,0264
Para Ho: Variâncias são iguais, F²= 1,32					DF= 9,9	Prob>F' = 0,6861		

Análise 70. Comparação da motilidade espermática entre os tratamentos na terceira inseminação no experimento I (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
T1	10	71,0000	2,1082	0,6667	Desigual	-2,4660	17,7	0,0242
T2	10	73,5000	2,4152	0,7638	Igual	-2,4660	18,0	0,0239
Para Ho: Variâncias são iguais, F²= 1,31					DF= 9,9	Prob>F' = 0,6920		

Análise 71. Comparação da motilidade espermática transformada (arcsen V%) entre os tratamentos na terceira inseminação no experimento I (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
T1	10	1,0024	0,0236	0,0075	Desigual	-2,4660	17,7	0,0242
T2	10	1,0304	0,0271	0,0086	Igual	-2,4660	18,0	0,0239
Para Ho: Variâncias são iguais, F²= 1,31					DF= 9,9	Prob>F' = 0,6920		

Análise 72. Comparação da duração da terceira inseminação entre os tratamentos no experimento I (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
T1	10	19,7000	9,7303	3,0770	Desigual	-0,6772	18	0,5069
T2	10	22,7000	10,0780	3,1870	Igual	-0,6772	18	0,5069
Para Ho: Variâncias são iguais, F²= 1,07					DF= 9,9	Prob>F' = 0,9184		

Análise 73. Comparação do intervalo entre a terceira inseminação e o final do cio entre os tratamentos no experimento I (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
T1	1	7,3300	-	-	Desigual	-	-	-
T2	4	12,2225	3,2515	1,6257	Igual	-1,3458	3,0	0,2710
Obs.: Todos os valores são os mesmos para um nível de classe								

Análise 74. Intervalos da coleta de sêmen à rediluição e da rediluição à terceira inseminação no experimento I

Variável	N	Média	EP	Minímo	Máximo	CV
Coleta-Redil.	10	12,5250	0,8671	9,7700	16,1300	21,8918
Redil.-IA	10	7,9110	2,0405	1,4500	15,9500	81,5659

Análise 75. Distribuição da utilização das duplas de machos entre os tratamentos na terceira inseminação no experimento I

Machos								
Tratamento	2	3	4	6	7	8	9	Total
T1	1	3	0	2	0	2	2	10
T2	0	2	1	0	4	1	2	10
Total	1	5	1	2	4	3	4	20

Análise 76. Comparação do vigor espermático na terceira inseminação entre os tratamentos no experimento I (Teste Wilcoxon)

Tratamento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p>Z
T1	10	8,5500	11,2390	85,5000	105	0,0909
T2	10	12,4500	11,2390	124,5000	105	

Análise 77. Comparação do intervalo da coleta do sêmen à quarta inseminação entre os tratamentos no experimento I (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
T1	9	26,4556	10,0058	3,3353	Desigual	-0,2992	12,6	0,7696
T2	6	27,8250	7,6764	3,1339	Igual	-0,2830	13,0	0,7816
Para Ho: Variâncias são iguais, F²= 1,70					DF= 8,5	Prob>F' = 0,5799		

Análise 78. Comparação do intervalo do início do cio à quarta inseminação entre os tratamentos no experimento I (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
T1	9	49,6578	1,2875	0,4292	Desigual	1,1915	12,3	0,2560
T2	6	49,0600	0,6366	0,2599	Igual	1,0459	13,0	0,3146
Para Ho: Variâncias são iguais, F²= 4,09					DF= 8,5	Prob>F' = 0,1374		

Análise 79. Comparação do intervalo entre a terceira e a quarta inseminações entre os tratamentos no experimento I (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
T1	9	12,8411	2,6043	0,8681	Desigual	-2,0378	9,1	0,0716
T2	6	14,6733	0,5733	0,2340	Igual	-1,6764	13,0	0,1175
Para Ho: Variâncias são iguais, F²= 20,64					DF= 8,5	Prob>F' = 0,0040		

Análise 80. Comparação da motilidade espermática entre os tratamentos na quarta inseminação no experimento I (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
T1	9	70,0000	0,0833	0,0833	Desigual	-1,0000	5,0	0,3632
T2	6	70,8333	2,0412	8,3333	Igual	-1,2490	13,0	0,2337
Obs.: Todos os valores são os mesmos para um nível de classe								

Análise 81. Comparação da motilidade espermática transformada (arcsen V%) entre os tratamentos na quarta inseminação no experimento I (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
T1	9	0,9912	0,0093	0,0093	Desigual	-1,0000	5,0	0,3632
T2	6	1,0005	2,2862	0,0093	Igual	-1,2490	13,0	0,2337
Obs.: Todos os valores são os mesmos para um nível de classe								

Análise 82. Comparação da duração da quarta inseminação entre os tratamentos no experimento I (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
T1	9	13,0000	6,9282	2,3094	Desigual	-1,5894	7,7	0,1523
T2	6	21,0000	10,9545	4,4721	Igual	-1,7447	13,0	0,1046
Para Ho: Variâncias são iguais, F²= 2,50					DF= 5,8	Prob>F' = 0,2395		

Análise 83. Comparação do intervalo da quarta inseminação ao final do cio entre os tratamentos no experimento I (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
T1	9	17,0611	6,5601	2,1867	Desigual	1,1765	8,9	0,2699
T2	6	12,2433	8,4806	3,4622	Igual	1,2423	13,0	0,2361
Para Ho: Variâncias são iguais, F²= 1,67					DF= 5,8	Prob>F' = 0,4937		

Análise 84. Intervalos da coleta de sêmen à rediluição e da rediluição à quarta inseminação no experimento I

Variável	N	Média	EP	Minímo	Máximo	CV
Coleta-Redil.	9	13,7678	1,0052	9,7700	16,1300	21,9036
Redil.-IA	9	12,8711	3,0202	2,3300	25,2700	70,3960

Análise 85. Distribuição da utilização das duplas de machos entre os tratamentos na quarta inseminação no experimento I

Tratamento	Machos					Total
	3	4	7	8	9	
T1	3	1	2	1	2	9
T2	4	0	0	1	1	6
Total	7	1	2	2	3	15

Análise 86. Comparação do vigor espermático na quarta inseminação entre os tratamentos no experimento I (Teste Wilcoxon)

Tratamento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p>Z
T1	9	7,8889	6,5727	71,0	72,0	0,9394
T2	6	8,1667	6,5727	49,0	48,0	

Análise 87. Comparação do intervalo da última inseminação ao final do cio no experimento I (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
T1	10	16,0880	6,9082	2,1846	Desigual	1,2758	18	0,2183
T2	10	12,2350	6,5939	2,0852	Igual	1,2758	18	0,2182
Para Ho: Variâncias são iguais, F²= 1,10					DF= 9,9	Prob>F' = 0,8919		

Análise 88. Comparação do vigor espermático entre os tratamentos na primeira inseminação no experimento I (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
T1	10	3,4000	0,3944	0,1247	Desigual	1,8783	17,8	0,0768
T2	10	3,0500	0,4378	0,1384	Igual	1,8783	18,0	0,0766
Para Ho: Variâncias são iguais, F²= 1,23					DF= 9,9	Prob>F' = 0,7609		

Análise 89. Comparação do vigor espermático entre os tratamentos na segunda inseminação no experimento I (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
T1	10	3,3500	0,4743	0,1500	Desigual	2,7405	17,8	0,0136
T2	10	2,8000	0,4216	0,1333	Igual	2,7505	18,0	0,0134
Para Ho: Variâncias são iguais, F²= 1,27					DF= 9,9	Prob>F' = 0,7314		

Análise 90. Comparação do vigor espermático entre os tratamentos na terceira inseminação no experimento I (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
T1	10	2,9500	0,4378	0,1384	Desigual	-1,4111	17,2	0,1761
T2	10	3,2000	0,3496	0,1106	Igual	-1,4111	18,0	0,1753
Para Ho: Variâncias são iguais, F²= 1,57					DF= 9,9	Prob>F' = 0,5133		

Análise 91. Comparação do vigor espermático entre os tratamentos na quarta inseminação no experimento I (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
T1	10	3,1667	0,5000	0,1667	Desigual	0,0000	12,3	1,0000
T2	10	3,1667	0,4082	0,1667	Igual	0,0000	13,0	1,0000
Para Ho: Variâncias são iguais, F²= 1,50					DF= 8,5	Prob>F' = 0,6805		

Ie. Análises estatísticas referentes à tabela 19

Análise 92. Comparação do número de inseminações entre os tratamentos no experimento I (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
T1	10	3,9000	0,3162	0,1000	Desigual	1,5667	14,9	0,1382
T2	10	3,6000	0,5164	0,1634	Igual	1,5667	18,0	0,1346
Para Ho: Variâncias são iguais, F²= 2,67					DF= 9,9	Prob>F' = 0,1601		

Análise 93. Comparação do IDC das fêmeas entre os tratamentos no experimento I (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
T1	10	94,0480	10,9139	3,4513	Desigual	-1,7129	16,1	0,1059
T2	10	101,2580	7,6205	2,4098	Igual	-1,7129	18,0	0,1039
Para Ho: Variâncias são iguais, F²= 2,05					DF= 9,9	Prob>F' = 0,2995		

Análise 94. Comparação da duração do estro das fêmeas entre os tratamentos no experimento I (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
T1	10	64,6990	8,8127	2,7868	Desigual	2,1638	18,0	0,0442
T2	10	55,9510	9,2619	2,9289	Igual	2,1638	18,0	0,0442
Para Ho: Variâncias são iguais, F²= 1,10					DF= 9,9	Prob>F' = 0,8847		

Análise 95. Análise do número de dias de retorno ao cio nos tratamentos no experimento I (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
T1	1	15,0000	-	-	Desigual	-	-	-
T2	1	23,0000	-	-	Igual	-	-	-
Obs.: Todos os valores são os mesmos para um nível de classe								

Análise 96. Intervalo da última inseminação ao retorno ao cio nos dois tratamentos no experimento I (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
T1	1	16,0000	-	-	Desigual	-	-	-
T2	1	24,0000	-	-	Igual	-	-	-
Obs.: Todos os valores são os mesmos para um nível de classe								

Análise 97. Comparação do número de leitões nascidos vivos entre os dois tratamentos no experimento I (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
T1	9	12,4444	3,7118	1,2373	Desigual	-0,0916	13,9	0,9283
T2	8	12,6250	4,3404	1,5346	Igual	-0,0925	15,0	0,9275
Para Ho: Variâncias são iguais, F²= 1,37					DF= 7,8	Prob>F' = 0,6667		

Análise 98. Comparação do número de leitões natimortos entre os dois tratamentos no experimento I (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
T1	9	1,1111	1,1667	0,3889	Desigual	0,6375	14,8	0,5336
T2	8	0,7500	1,1650	0,4119	Igual	0,6374	15,0	0,5335
Para Ho: Variâncias são iguais, F²= 1,00					DF= 8,7	Prob>F' = 1,0000		

Análise 99. Comparação do número de leitões mumificados entre os dois tratamentos no experimento I (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
T1	9	1,5556	3,9405	1,3135	Desigual	1,0088	8,2	0,3420
T2	9	0,2222	0,4410	0,1470	Igual	1,0088	16,0	0,3281
Para Ho: Variâncias são iguais, F²= 79,86					DF= 8,8	Prob>F' = 0,0000		

Análise 100. Comparação do número de leitões nascidos totais entre os dois tratamentos no experimento I (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
T1	9	15,1111	3,9826	1,3275	Desigual	0,8177	15,6	0,4258
T2	9	13,4444	4,6398	1,5466	Igual	0,8177	16,0	0,4255
Para Ho: Variâncias são iguais, F²= 1,36					DF= 8,8	Prob>F' = 0,6760		

Análise 101. Comparação das taxas de gestação entre os tratamentos

Tratamento	Gestante	Não gestante	Total
T1	9	1	10
T2	9	1	10
Total	18	2	20

Teste Estatístico	Valor	GL	P>
Qui - Quadrado	0,000	1	1,000

II. Análises estatísticas referentes ao Experimento II

IIa. Análises estatísticas referentes à tabela 22

Análise 102: Distribuição da utilização dos machos entre os tratamentos no experimento II

Duplas de Machos										
Tratamento	5	10	11	12	13	14	15	16	17	Total
T1	1	2	1	1	2	1	1	1	0	10
T2	1	2	1	1	2	1	1	1	1	11
Total	2	4	2	2	4	2	2	2	1	21

Teste Estatístico	Valor	GL	p>
Qui - Quadrado	0,955	8	0,999

Análise 103: Comparação da motilidade espermática entre os tratamentos de acordo com o momento (arsen V%) no experimento II

Análise de Variância					
Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	p
Modelo	10	0,6305	0,0630	25,55	0,0001
Erro	89	0,2196	0,0025		
Total	99	0,8501			

Coefficiente de variação: 4,5227

Teste estatístico	Agrupamento pelo Teste					
	Fresco	0h	12h	Redil.	24h	36 h
SNK (p<0,05)	a	a	b	c	cd	d

Análise 104. Comparação da motilidade espermática entre os tratamentos no experimento II

Análise de Variância					
Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	p
Modelo	6	4050,2000	675,0333	44,66	0,0001
Erro	93	1405,8000	15,1161		
Total	99	5456,0000			

Coefficiente de variação: 4,9339

Análise 105. Comparação da motilidade espermática entre os tratamentos nos diferentes momentos de avaliação no experimento II

Tratamento x Momento	Média	DP	p
T1 Fresco	86,5000	1,2423	0,0001
T1 0h	85,0000	1,2423	
T1 12h	78,8889	1,3095	
T1 Rediluído	73,8889	1,3095	
T1 24h	71,1111	1,3095	
T1 36h	68,3333	1,6038	
T2 Fresco	86,3636	1,1845	
T2 0h	84,5455	1,1845	
T2 12h	77,7273	1,1845	
T2 24h	72,2222	1,3095	
T2 36h	71,0000	1,7569	

IIIb. Análises estatísticas referentes à tabela 23

Análise 106. Comparação do vigor espermático entre os tratamentos de acordo com o momento no experimento II

Análise de Variância					
Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	p
Modelo	10	8,7921	0,8792	4,97	0,0001
Erro	89	15,7354	0,1768		
Total	99	24,5275			

Coefficiente de variação: 12,6080

Análise 107. Comparação do vigor espermático entre os tratamentos nos diferentes momentos no experimento II (Teste Wilcoxon)

Tratamento x Momento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p
T1 Fresco	10	70,0000	75,8063	700,0000	505,0000	0,0001
T1 0h	10	66,8000	75,8063	668,0000	505,0000	
T1 12h	9	50,0000	72,3146	450,0000	454,5000	
T1 Rediluído	9	44,3333	72,3146	399,0000	454,5000	
T1 24h	9	33,0000	72,3146	297,0000	454,5000	
T1 36h	6	22,5833	60,0099	135,5000	303,0000	
T2 Fresco	11	71,2727	79,0634	784,0000	555,5000	
T2 0h	11	56,1818	79,0634	618,0000	555,5000	
T2 12h	11	46,9091	79,0634	516,0000	555,5000	
T2 24h	9	38,6667	72,3146	348,0000	454,5000	
T2 36h	5	26,9000	55,0720	134,0000	252,5000	

Análise 108. Comparação do vigor espermático entre o tempo 0 hora e o sêmen fresco dentro do tratamento 1 (Teste Wilcoxon)

Momento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p>Z
0 hora	10	10,3000	11,5849	103,0000	105,0000	0,8970
Fresco	10	10,7000	11,5849	107,0000	105,0000	

Análise 109. Comparação do vigor espermático entre o tempo 12 horas e o sêmen fresco dentro do tratamento 1 (Teste Wilcoxon)

Momento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p>Z
12 horas	9	8,0000	11,0917	72,0000	90,0000	0,1146
Fresco	10	11,8000	11,0917	118,0000	100,0000	

Análise 110. Comparação do vigor espermático entre o sêmen fresco e o sêmen rediluído dentro do tratamento 1 (Teste Wilcoxon)

Momento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p>Z
Fresco	10	12,4000	11,0917	124,0000	100,0000	0,0341
Rediluído	9	7,3333	11,0917	66,0000	90,0000	

Análise 111. Comparação do vigor espermático entre o tempo 24 horas e o sêmen fresco dentro do tratamento 1 (Teste Wilcoxon)

Momento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p>Z
24 horas	9	6,0000	10,7850	54,0000	90,0000	0,0010
Fresco	10	13,6000	10,7850	136,0000	100,0000	

Análise 112. Comparação do vigor espermático entre o tempo 36 horas e o sêmen fresco dentro do tratamento 1 (Teste Wilcoxon)

Momento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p>Z
36 horas	6	4,1667	8,7250	25,0000	51,0000	0,0035
Fresco	10	11,1000	8,7250	111,0000	85,0000	

Análise 113. Comparação do vigor espermático entre o tempo 0 hora e o tempo 12 horas dentro do tratamento 1 (Teste Wilcoxon)

Momento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p>Z
0 hora	10	11,5000	10,8821	115,0000	100,0000	0,1827
12 horas	9	8,3333	10,8821	75,0000	90,0000	

Análise 114. Comparação do vigor espermático entre o tempo 0 hora e o sêmen rediluído dentro do tratamento 1 (Teste Wilcoxon)

Momento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p>Z
0 hora	10	12,0500	10,8276	120,5000	100,0000	0,0647
Rediluído	9	7,7222	10,8276	69,5000	90,0000	

Análise 115. Comparação do vigor espermático entre o tempo 0 hora e o tempo 24 horas dentro do tratamento 1 (Teste Wilcoxon)

Momento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p>Z
0 hora	10	13,1500	10,3809	131,5000	100,0000	0,0028
24 horas	9	6,5000	10,3809	58,5000	90,0000	

Análise 116. Comparação do vigor espermático entre o tempo 0 hora e o tempo 36 horas dentro do tratamento 1 (Teste Wilcoxon)

Momento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p>Z
0 hora	10	10,9000	8,5805	109,0000	85,0000	0,0062
36 horas	6	4,5000	8,5805	27,0000	51,0000	

Análise 117. Comparação do vigor espermático entre o tempo 12 horas e o sêmen rediluído dentro do tratamento 1 (Teste Wilcoxon)

Momento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p>Z
12 horas	9	10,0000	8,7992	90,0000	85,5000	0,6494
Rediluído	9	9,0000	8,7992	81,0000	85,5000	

Análise 118. Comparação do vigor espermático entre o tempo 12 horas e o tempo 24 horas dentro do tratamento 1 (Teste Wilcoxon)

Momento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p>Z
12 horas	9	11,0000	7,3214	99,0000	85,5000	0,0758
24 horas	9	8,0000	7,3214	72,0000	85,5000	

Análise 119. Comparação do vigor espermático entre o tempo 12 horas e o tempo 36 horas dentro do tratamento 1 (Teste Wilcoxon)

Momento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p>Z
12 horas	9	9,6667	7,0902	87,0000	72,0000	0,0408
36 horas	6	5,5000	7,0902	33,0000	48,0000	

Análise 120. Comparação do vigor espermático entre o tempo 24 horas e o sêmen rediluído dentro do tratamento 1 (Teste Wilcoxon)

Momento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p>Z
24 horas	9	8,5000	6,1739	76,5000	85,5000	0,1686
Rediluído	9	10,5000	6,1739	94,5000	85,5000	

Análise 121. Comparação do vigor espermático entre o tempo 36 horas e o sêmen rediluído dentro do tratamento 1 (Teste Wilcoxon)

Momento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p>Z
36 horas	6	5,8333	6,6019	35,0000	48,0000	0,0583
Rediluído	9	9,4444	6,6019	85,0000	72,0000	

Análise 122. Comparação do vigor espermático entre o tempo 24 horas e o tempo 36 horas dentro do tratamento 1 (Teste Wilcoxon)

Momento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p>Z
24 horas	9	9,0000	5,0200	81,0000	72,0000	0,0904
36 horas	6	6,5000	5,0200	39,0000	48,0000	

Análise 123. Comparação do vigor espermático entre o tempo 0 hora e o sêmen fresco dentro do tratamento 2 (Teste Wilcoxon)

Momento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p>Z
0 hora	11	9,9545	13,5401	109,5000	126,5000	0,2230
Fresco	11	13,0455	13,5401	143,5000	126,5000	

Análise 124. Comparação do vigor espermático entre o tempo 12 horas e o sêmen fresco dentro do tratamento 2 (Teste Wilcoxon)

Momento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p>Z
12 horas	11	8,7727	13,7321	96,5000	126,5000	0,0317
Fresco	11	14,2273	13,7321	156,5000	126,5000	

Análise 125. Comparação do vigor espermático entre o tempo 24 horas e o sêmen fresco dentro do tratamento 2 (Teste Wilcoxon)

Momento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p>Z
24 horas	9	6,7222	11,8610	60,5000	94,5000	0,0047
Fresco	11	13,5909	11,8610	149,5000	115,5000	

Análise 126. Comparação do vigor espermático entre o tempo 36 horas e o sêmen fresco dentro do tratamento 2 (Teste Wilcoxon)

Momento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p>Z
36 horas	5	3,8000	8,2082	19,0000	42,5000	0,0051
Fresco	11	10,6364	8,2082	117,0000	93,5000	

Análise 127. Comparação do vigor espermático entre o tempo 0 hora e o tempo 12 horas dentro do tratamento 2 (Teste Wilcoxon)

Momento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p>Z
0 hora	11	12,5000	12,7017	137,5000	126,5000	0,4084
12 horas	11	10,5000	12,7017	115,5000	126,5000	

Análise 128. Comparação do vigor espermático entre o tempo 0 hora e o tempo 24 horas dentro do tratamento 2 (Teste Wilcoxon)

Momento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p>Z
0 hora	11	12,0455	10,4605	132,5000	115,5000	0,1147
24 horas	9	8,6111	10,4605	77,5000	94,5000	

Análise 129. Comparação do vigor espermático entre o tempo 0 hora e o tempo 36 horas dentro do tratamento 2 (Teste Wilcoxon)

Momento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p>Z
0 hora	11	9,9091	7,5312	109,0000	93,5000	0,0464
36 horas	5	5,4000	7,5312	27,0000	42,5000	

Análise 130. Comparação do vigor espermático entre o tempo 12 horas e o tempo 24 horas dentro do tratamento 2 (Teste Wilcoxon)

Momento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p>Z
12 horas	11	11,2273	9,1306	123,5000	115,5000	0,4114
24 horas	9	9,6111	9,1306	86,5000	94,5000	

Análise 131. Comparação do vigor espermático entre o tempo 12 horas e o tempo 36 horas dentro do tratamento 2 (Teste Wilcoxon)

Momento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p>Z
12 horas	11	9,5455	6,6849	105,0000	93,5000	0,0999
36 horas	5	6,2000	6,6849	31,0000	42,5000	

Análise 132. Comparação do vigor espermático entre o tempo 24 horas e o tempo 36 horas dentro do tratamento 2 (Teste Wilcoxon)

Momento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p>Z
24 horas	9	8,2222	4,5709	74,0000	67,5000	0,1893
36 horas	5	6,2000	4,5709	31,0000	37,5000	

Análise 133. Comparação do vigor espermático entre os tratamentos para o sêmen a fresco no experimento II (Teste Wilcoxon)

Momento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p>Z
Fresco T1	10	10,8000	12,3037	108,0000	110,0000	0,9030
Fresco T2	11	11,1818	12,3037	123,0000	121,0000	

Análise 134. Comparação do vigor espermático entre os tratamentos para o sêmen no tempo 0h no experimento II (Teste Wilcoxon)

Momento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p>Z
0 hora T1	10	12,1000	12,5357	121,0000	110,0000	0,4022
0 hora T2	11	10,0000	12,5357	110,0000	121,0000	

Análise 135. Comparação do vigor espermático entre os tratamentos para o sêmen no tempo 12 horas no experimento II (Teste Wilcoxon)

Momento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p>Z
12 horas T1	9	10,8333	10,4605	97,5000	94,5000	0,8111
12 horas T2	11	10,2273	10,4605	112,5000	115,5000	

Análise 136. Comparação do vigor espermático entre os tratamentos para o sêmen no tempo 24 horas no experimento II (Teste Wilcoxon)

Momento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p>Z
24 horas T1	9	9,0000	4,5000	81,0000	85,5000	0,3741
24 horas T2	9	10,0000	4,5000	90,0000	85,5000	

Análise 137. Comparação do vigor espermático entre os tratamentos para o sêmen no tempo 36 horas no experimento II (Teste Wilcoxon)

Momento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p>Z
36 horas T1	6	5,5833	4,2906	33,5000	36,0000	0,6411
36 horas T2	5	6,5000	4,2906	32,5000	30,0000	

Ic. Análises estatísticas referentes à tabela 24

Análise 138. Comparação da motilidade espermática entre os tratamentos no experimento II (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
1	10	86,5000	2,4152	0,7638	Desigual	0,1313	18,7	0,8970
2	11	86,3636	2,3355	0,7042	Igual	0,1315	19,0	0,8968
Para Ho: Variâncias são iguais, F'= 1,07					DF= 9,10	Prob>F' = 0,9106		

Análise 139. Comparação da motilidade espermática transformada (arcsen V%) entre os tratamentos no experimento II (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
1	10	1,1959	0,0367	0,0116	Desigual	0,1313	18,7	0,8970
2	11	1,1938	0,0355	0,0107	Igual	0,1315	19,0	0,8968
Para Ho: Variâncias são iguais, F'= 1,07					DF= 9,10	Prob>F' = 0,9106		

Análise 140. Comparação do número de espermatozoides totais ($\times 10^6$) por mL da P1 entre os tratamentos no experimento II (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
1	10	701,2500	121,6852	38,4802	Desigual	0,2951	18,9	0,7712
2	11	685,2273	121,0849	38,3175	Igual	0,2944	19,0	0,7716
Para Ho: Variâncias são iguais, F²= 1,09					DF= 10,9	Prob>F' = 0,9057		

Análise 141. Comparação do número de espermatozoides móveis ($\times 10^6$) por mL da P1 entre os tratamentos no experimento II (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
1	10	605,7500	100,3106	31,7210	Desigual	0,3211	19,0	0,7517
2	11	591,2500	106,6243	32,1484	Igual	0,3201	19,0	0,7524
Para Ho: Variâncias são iguais, F²= 1,13					DF= 10,9	Prob>F' = 0,8641		

Análise 142. Comparação do número de espermatozoides totais ($\times 10^9$) da P1 entre os tratamentos no experimento II (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
1	10	42,0750	7,3011	2,3088	Desigual	0,2951	18,9	0,7712
2	11	41,1136	7,6251	2,2991	Igual	0,2944	19,0	0,7716
Para Ho: Variâncias são iguais, F²= 1,09					DF= 10,9	Prob>F' = 0,9057		

Análise 143. Comparação do número de espermatozoides móveis ($\times 10^9$) da P1 entre os tratamentos no experimento II (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
1	10	36,3460	6,0162	1,9025	Desigual	0,3212	19,0	0,7516
2	11	35,4759	6,3955	1,9283	Igual	0,3202	19,0	0,7523
Para Ho: Variâncias são iguais, F²= 1,13					DF= 10,9	Prob>F' = 0,8638		

Análise 144. Comparação do volume de sêmen entre os tratamentos no experimento II (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
1	10	20,2350	3,0356	0,9599	Desigual	18,1917	9,3	0,0001
2	11	2,6045	0,4418	0,1332	Igual	19,0900	19,0	0,0000
Para Ho: Variâncias são iguais, F²= 47,20					DF= 9,10	Prob>F' = 0,0000		

Análise 145. Comparação do volume de diluidor utilizado entre os tratamentos no experimento II (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
1	10	20,2350	3,0356	0,9599	Desigual	18,1917	9,3	0,0001
2	11	2,6045	0,4418	0,1332	Igual	19,0900	19,0	0,0000
Para Ho: Variâncias são iguais, F²= 47,20					DF= 9,10	Prob>F' = 0,0000		

Análise 146. Comparação do número de espermatozoides totais por dose inseminante entre os tratamentos no experimento II (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
1	10	27,7300	0,7465	0,2361	Desigual	101,9563	9,3	0,0001
2	11	3,4718	0,0982	0,0296	Igual	107,0313	19,0	0,0000
Para Ho: Variâncias são iguais, F²= 57,84					DF= 9,10	Prob>F' = 0,0000		

Análise 147. Comparação do número de espermatozoides móveis por dose inseminante entre os tratamentos no experimento II (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
1	10	23,9650	0,0387	0,0122	Desigual	1604,1781	11,6	0,0001
2	11	2,9918	0,0154	0,0046	Igual	1663,8415	19,0	0,0000
Para Ho: Variâncias são iguais, F'= 6,32					DF= 9,10	Prob>F' = 0,0080		

Análise 148. Comparação do número de doses inseminantes produzidas entre tratamentos no experimento II (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
1	10	8,0000	0,06	0,06	Desigual	7,0624	10,0	0,0001
2	11	3,9091	1,92	5,79	Igual	6,7176	19,0	0,0000
Obs: Todos os valores são os mesmos para um nível de classe								

Análise 149. Comparação do número real de fêmeas inseminadas entre os tratamentos no experimento II (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
1	10	2,9000	1,1972	0,3786	Desigual	0,7840	15,7	0,4447
2	11	2,5455	0,8202	0,2473	Igual	0,7984	19,0	0,4345
Para Ho: Variâncias são iguais, F'= 2,13					DF= 9,10	Prob>F' = 0,2543		

IId. Análises estatísticas referentes à tabela 25

Análise 150. Comparação do número total de inseminações entre os tratamentos no experimento II (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
1	10	3,8000	0,4216	0,1333	Desigual	1,4056	17,2	0,1777
2	10	3,5000	0,5270	0,1667	Igual	1,4056	18,0	0,1769
Para Ho: Variâncias são iguais, F'= 1,56					DF= 9,9	Prob>F' = 0,5166		

Análise 151. Comparação do intervalo da coleta de sêmen à primeira inseminação artificial entre os tratamentos no experimento II (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
1	10	18,9330	8,0277	2,5386	Desigual	0,5028	17,9	0,6213
2	10	17,1940	7,4289	2,3492	Igual	0,5028	18,0	0,6212
Para Ho: Variâncias são iguais, F'= 1,17					DF= 9,9	Prob>F' = 0,8211		

Análise 152. Comparação do intervalo do início do cio à primeira inseminação entre os tratamentos no experimento II (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
1	10	11,5440	2,4037	0,7601	Desigual	-0,0609	17,6	0,9521
2	10	11,6050	2,0607	0,6516	Igual	-0,0609	18,0	0,9521
Para Ho: Variâncias são iguais, F'= 1,36					DF= 9,9	Prob>F' = 0,6539		

Análise 153. Comparação da motilidade espermática entre os tratamentos na primeira inseminação no experimento II (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
1	10	73,0000	4,8305	1,5275	Desigual	-1,7504	17,8	0,0973
2	10	77,0000	5,3748	1,6997	Igual	-1,7504	18,0	0,0971
Para Ho: Variâncias são iguais, F'= 1,24						DF= 9,9	Prob>F' = 0,7556	

Análise 154. Comparação da motilidade espermática transformada (arcsen V%) entre os tratamentos na primeira inseminação no experimento II (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
1	10	1,0260	0,0560	0,0177	Desigual	-1,7345	17,6	0,1003
2	10	1,0732	0,0653	0,0207	Igual	-1,7345	18,0	0,0999
Para Ho: Variâncias são iguais, F'= 1,36						DF= 9,9	Prob>F' = 0,6531	

Análise 155. Comparação da duração da primeira inseminação entre os tratamentos no experimento II (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
1	10	25,3000	6,7995	2,1502	Desigual	-0,2887	15,9	0,7765
2	10	26,4000	9,9465	3,1454	Igual	-0,2887	18,0	0,7761
Para Ho: Variâncias são iguais, F'= 2,14						DF= 9,9	Prob>F' = 0,2725	

Análise 156. Intervalos da coleta de sêmen à rediluição e da rediluição à primeira inseminação no experimento II

Variável	N	Média	Erro P	Mínimo	Máximo	CV
Coleta-Redil.	10	12,9720	0,8049	10,5000	16,6300	19,6211
Redil.-IA	10	5,9610	2,0262	0,8700	17,3700	107,4913

Análise 157. Distribuição da utilização das duplas de machos entre os tratamentos na primeira inseminação no experimento II

Frequência	10	11	13	16	Total
1	3	1	3	3	10
2	2	2	3	3	10
Total	5	3	6	6	20

Análise 158. Comparação do vigor espermático entre os tratamentos na primeira inseminação no experimento II (Teste Wilcoxon)

Tratamento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p
1	10	9,5000	11,2390	95,0	105,0	0,3980
2	10	11,5000	11,2390	115,0	105,0	

Análise 159. Comparação do intervalo da coleta de sêmen à segunda inseminação artificial entre os tratamentos no experimento II (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
1	10	27,1050	0,4366	0,1381	Desigual	2,4382	9,1	0,0372
2	10	22,6930	5,7056	1,8043	Igual	2,4382	18,0	0,0254
Para Ho: Variâncias são iguais, F'= 170,75						DF= 9,9	Prob>F' = 0,0000	

Análise 160. Comparação entre o intervalo do início do cio à segunda inseminação artificial entre os tratamentos no experimento II (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
1	10	25,6120	0,6247	0,1975	Desigual	-0,3939	17,8	0,6983
2	10	25,7290	0,7015	0,2218	Igual	-0,3939	18,0	0,6983
Para Ho: Variâncias são iguais, F'= 1,26					DF= 9,9	Prob>F' = 0,7353		

Análise 161. Comparação do intervalo entre a primeira e a segunda inseminações entre os tratamentos no experimento II (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
1	10	13,8710	1,9887	0,6289	Desigual	-0,1837	17,3	0,8564
2	10	14,0200	1,6201	0,5123	Igual	-0,1837	18,0	0,8563
Para Ho: Variâncias são iguais, F'= 1,51					DF= 9,9	Prob>F' = 0,5511		

Análise 162. Comparação da motilidade espermática entre os tratamentos na segunda inseminação no experimento II (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
1	10	70,5000	1,5811	0,5000	Desigual	-1,2377	10,9	0,2419
2	10	72,5000	4,8591	1,5366	Igual	-1,2377	18,0	0,2317
Para Ho: Variâncias são iguais, F'= 9,44					DF= 9,9	Prob>F' = 0,0026		

Análise 163. Comparação da motilidade espermática transformada (arcsen V%) entre os tratamentos na segunda inseminação no experimento II (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
1	10	0,9968	0,0177	0,0056	Desigual	-1,2323	10,6	0,2444
2	10	1,0206	0,0584	0,0185	Igual	-1,2323	18,0	0,2337
Para Ho: Variâncias são iguais, F'= 10,89					DF= 9,9	Prob>F' = 0,0015		

Análise 164. Comparação da duração da segunda inseminação entre os tratamentos no experimento II (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
1	10	25,4000	6,7856	2,1458	Desigual	0,1815	14,1	0,8586
2	10	24,6000	12,1765	3,8505	Igual	0,1815	18,0	0,8580
Para Ho: Variâncias são iguais, F'= 3,22					DF= 9,9	Prob>F' = 0,0965		

Análise 165. Intervalos da coleta de sêmen à rediluição e da rediluição do sêmen à segunda inseminação no experimento II

Variável	N	Média	Erro P	Mínimo	Máximo	CV
Coleta-Redil.	10	11,7410	0,5602	10,5000	16,5800	15,0891
Redil.-IA	10	15,3640	0,5864	10,6700	17,3700	12,0691

Análise 166. Distribuição da utilização das duplas de machos entre os tratamentos na segunda inseminação no experimento II

Frequência	5	10	11	12	13	16	Total
1	0	0	3	1	3	3	10
2	1	2	3	1	3	0	10
Total	1	2	6	2	6	3	20

Análise 167. Comparação do vigor espermático entre os tratamentos na segunda inseminação no experimento II (Teste Wilcoxon)

Tratamento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p>Z
1	10	10,5000	0,0	105,0	105,0	1,0000
2	10	10,5000	0,0	105,0	105,0	

Análise 168. Comparação do intervalo da coleta do sêmen à terceira inseminação entre os tratamentos no experimento II (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
1	10	26,9740	0,6254	0,1978	Desigual	1,1100	9,1	0,2954
2	10	24,3080	7,5693	2,3936	Igual	1,1100	18,0	0,2816
Para Ho: Variâncias são iguais, F'= 146,49					DF= 9,9	Prob>F' = 0,0000		

Análise 169. Comparação do intervalo do início do cio à terceira inseminação entre os tratamentos no experimento II (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
1	10	35,1280	2,1108	0,6675	Desigual	0,1317	17,8	0,8967
2	10	34,9970	2,3312	0,7372	Igual	0,1317	18,0	0,8967
Para Ho: Variâncias são iguais, F'= 1,22					DF= 9,9	Prob>F' = 0,7722		

Análise 170. Comparação do intervalo entre a segunda e a terceira inseminações entre os tratamentos no experimento II (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
1	10	9,5140	1,8158	0,5742	Desigual	0,4110	17,5	0,6861
2	10	9,1480	2,1525	0,6807	Igual	0,4110	18,0	0,6859
Para Ho: Variâncias são iguais, F'= 1,41					DF= 9,9	Prob>F' = 0,6204		

Análise 171. Comparação da motilidade espermática entre os tratamentos na terceira inseminação no experimento II (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
1	10	73,0000	2,5820	0,8165	Desigual	0,0000	13,8	1,0000
2	10	73,0000	4,8305	1,5275	Igual	0,0000	18,0	1,0000
Para Ho: Variâncias são iguais, F'= 3,50					DF= 9,9	Prob>F' = 0,0760		

Análise 172. Comparação da motilidade espermática transformada (arcsen V%) entre os tratamentos na terceira inseminação no experimento II (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
1	10	1,0248	0,0289	0,0091	Desigual	-0,0678	13,2	0,9469
2	10	1,0262	0,0580	0,0183	Igual	-0,0678	18,0	0,9467
Para Ho: Variâncias são iguais, F'= 4,02					DF= 9,9	Prob>F' = 0,0502		

Análise 173. Comparação da duração da terceira inseminação entre os tratamentos no experimento II (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
1	10	16,3000	8,0836	2,5563	Desigual	-1,1612	17,7	0,2610
2	10	20,8000	9,2111	2,9128	Igual	-1,1612	18,0	0,2607
Para Ho: Variâncias são iguais, F'= 1,30					DF= 9,9	Prob>F' = 0,7036		

Análise 174. Comparação do intervalo entre a terceira inseminação e o final do cio entre os tratamentos no experimento II (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
1	2	13,9600	0,0141	0,0100	Desigual	1,5123	4,0	0,2047
2	5	13,6740	0,4223	0,1889	Igual	0,9049	5,0	0,4070
Para Ho: Variâncias são iguais, F²= 891,65					DF= 4,1	Prob>F² = 0,0502		

Análise 175. Intervalos da coleta de sêmen à rediluição e da rediluição à terceira inseminação no experimento II

Variável	N	Média	Erro P	Minímo	Máximo	CV
Coleta-Redil.	10	16,2510	0,6087	10,9500	17,5200	11,8439
Redil.-IA	10	10,7670	0,5716	9,7000	15,6500	16,7893

Análise 176. Distribuição da utilização das duplas de machos entre os tratamentos na terceira inseminação no experimento II

Frequência	5	10	12	13	14	17	Total
1	0	3	3	1	3	0	10
2	1	0	4	1	2	2	10
Total	1	3	7	2	5	2	20

Análise 177. Comparação do vigor espermático na terceira inseminação entre os tratamentos no experimento II (Teste Wilcoxon)

Momento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p
1	10	10,0	5,0	100,0	105,0	0,3681
2	10	11,0	5,0	110,0	105,0	

Análise 178. Comparação do intervalo da coleta do sêmen à quarta inseminação entre os tratamentos no experimento I (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
1	8	30,9325	7,0478	2,4918	Desigual	0,9491	10,9	0,3631
2	5	28,0560	3,8575	1,7251	Igual	0,8293	11,0	0,4246
Para Ho: Variâncias são iguais, F²= 3,34					DF= 7,4	Prob>F² = 0,2611		

Análise 179. Comparação do intervalo do início do cio à quarta inseminação entre os tratamentos no experimento II (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
1	8	49,1125	0,4061	0,1436	Desigual	-0,9521	4,8	0,3866
2	5	49,5640	1,0107	0,4520	Igual	-1,1475	11,0	0,2755
Para Ho: Variâncias são iguais, F²= 6,20					DF= 4,7	Prob>F² = 0,0374		

Análise 180. Comparação do intervalo entre a terceira e a quarta inseminação entre os tratamentos no experimento II (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
1	8	13,8050	2,6619	0,9411	Desigual	-0,1061	9,5	0,9177
2	5	13,9540	2,3317	1,0428	Igual	-0,1026	11,0	0,9201
Para Ho: Variâncias são iguais, F²= 1,30					DF= 7,4	Prob>F² = 0,8420		

Análise 181. Comparação da motilidade espermática entre os tratamentos na quarta inseminação no experimento II (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
1	8	70,0000	0,0024	0,0024	Desigual	-1,6330	4,0	0,1778
2	5	74,0000	5,4772	2,4495	Igual	-2,1243	11,0	0,0571

Obs: Todos os valores são os mesmos para um nível de classe

Análise 182. Comparação da motilidade espermática transformada (arcsen V%) entre os tratamentos na quarta inseminação no experimento II (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
1	8	0,9912	0,0028	0,0028	Desigual	-1,6330	4,0	0,1778
2	5	1,0376	6,3481	2,8390	Igual	-2,1243	11,0	0,0571

Obs: Todos os valores são os mesmos para um nível de classe

Análise 183. Comparação da duração da quarta inseminação entre os tratamentos no experimento II (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
1	8	17,6250	8,1053	2,8657	Desigual	0,0596	10,8	0,9536
2	5	17,4000	5,5045	2,4617	Igual	0,0543	11,0	0,9577

Para Ho: Variâncias são iguais, F' = 2,17 DF = 7,4 Prob>F' = 0,4742

Análises 184. Comparação do intervalo da quarta inseminação ao final do cio entre os tratamentos no experimento II (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
1	8	16,2475	8,6240	3,0490	Desigual	2,4675	8,8	0,0364
2	5	8,2180	2,5420	1,1368	Igual	1,9983	11,0	0,0710

Para Ho: Variâncias são iguais, F' = 11,51 DF = 7,4 Prob>F' = 0,0325

Análise 185. Intervalos da coleta de sêmen à rediluição e da rediluição à quarta inseminação no experimento II

Variável	N	Média	Erro P	Mínimo	Máximo	CV
Coleta-Redil.	8	12,2750	0,9049	10,7800	16,4200	20,8507
Redil.-IA	8	18,6575	1,6873	14,8900	25,1300	25,5791

Análise 186. Distribuição da utilização das duplas de machos entre os tratamentos na quarta inseminação no experimento II

Frequência	5	13	14	15	17	Total
1	2	4	2	0	0	8
2	0	2	0	2	1	5
Total	2	6	2	2	1	13

Análise 187. Comparação do vigor espermático na quarta inseminação entre os tratamentos no experimento II (Teste t)

Momento	N	Média	DP	Sum Sco.	Expected	p>Z
1	8	7,0	0,0	56,0	56,0	
2	5	7,0	0,0	35,0	35,0	1,0000

Análise 188. Comparação do intervalo da última inseminação ao final do cio no experimento II (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
1	10	15,7900	7,6665	2,4244	Desigual	1,8308	12,3	0,0914
2	10	10,9460	3,3496	1,0592	Igual	1,8309	18,0	0,0837
Para Ho: Variâncias são iguais, F'= 5,24						DF= 9,9	Prob>F' = 0,0215	

Análise 189. Comparação do vigor espermático entre os tratamentos na primeira inseminação no experimento II (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
1	10	3,3000	0,4830	0,1528	Desigual	-0,8847	17,9	0,3881
2	10	3,5000	0,5270	0,1667	Igual	-0,8847	18,0	0,3880
Para Ho: Variâncias são iguais, F'= 1,19						DF= 9,9	Prob>F' = 0,7993	

Análise 190. Comparação do vigor espermático entre os tratamentos na segunda inseminação no experimento II (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
1	10	3,0000	0,0000	0,0000	Desigual	-	-	-
2	10	3,0000	0,0000	0,0000	Igual	-	-	-
Obs: Todos os valores são os mesmos para um nível de classe								

Análise 191. Comparação do vigor espermático entre os tratamentos na terceira inseminação no experimento II (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
1	10	3,0000	0,000	0,0000	Desigual	-1,0000	9,0	0,3434
2	10	3,1000	0,032	0,01	Igual	-1,0000	18,0	0,3306
Obs: Todos os valores são os mesmos para um nível de classe								

Análise 192. Comparação do vigor espermático entre os tratamentos na quarta inseminação no experimento II (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
1	8	3,0000	0,0000	0,0000	Desigual	-	-	-
2	5	3,0000	0,0000	0,0000	Igual	-	-	-
Obs: Todos os valores são os mesmos para um nível de classe								

IIe. Análises estatísticas referentes à tabela 26

Análise 193. Comparação do número de inseminações entre os tratamentos no experimento II (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
1	10	3,8000	0,4216	0,1333	Desigual	1,4056	17,2	0,1777
2	10	3,5000	0,5270	0,1667	Igual	1,4056	18,0	0,1769
Para Ho: Variâncias são iguais, F'= 1,56						DF= 9,9	Prob>F' = 0,5166	

Análise 194. Comparação do IDC das fêmeas entre os tratamentos no experimento II (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
1	10	98,8460	2,5741	0,8140	Desigual	0,8742	10,7	0,4012
2	10	96,4280	8,3591	2,6434	Igual	0,8742	18,0	0,3935
Para Ho: Variâncias são iguais, F'= 10,55					DF= 9,9	Prob>F' = 0,0017		

Análise 195. Comparação da duração do estro das fêmeas entre os tratamentos no experimento II (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
1	10	61,6340	9,9803	3,1560	Desigual	2,4088	14,2	0,0301
2	10	52,8960	5,6556	1,7885	Igual	2,4088	18,0	0,0269
Para Ho: Variâncias são iguais, F'= 3,11					DF= 9,9	Prob>F' = 0,1059		

Análise 196. Comparação do número de leitões nascidos vivos entre os dois tratamentos no experimento II (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
1	10	13,2000	2,8597	0,9043	Desigual	-1,0212	12,6	0,3264
2	8	14,8750	3,8707	1,3685	Igual	-1,0573	16,0	0,3061
Para Ho: Variâncias são iguais, F'= 1,83					DF= 7,9	Prob>F' = 0,3911		

Análise 197. Comparação do número de leitões natimortos entre os dois tratamentos no experimento II (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
1	10	0,6000	1,0750	0,3399	Desigual	-0,0494	15,2	0,9612
2	8	0,6250	1,0607	0,3750	Igual	-0,0493	16,0	0,9613
Para Ho: Variâncias são iguais, F'= 1,03					DF= 9,7	Prob>F' = 0,9950		

Análise 198. Comparação do número de leitões mumificados entre os dois tratamentos no experimento II (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
1	10	0,2000	0,4216	0,1333	Desigual	-1,5460	8,0	0,1607
2	8	1,0000	1,4142	0,5000	Igual	-1,7080	16,0	0,1070
Para Ho: Variâncias são iguais, F'= 11,25					DF= 7,9	Prob>F' = 0,0017		

Análise 199. Comparação do número de leitões nascidos totais entre os dois tratamentos no experimento II (Teste t)

Tratamento	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
1	10	14,0000	3,4319	1,0853	Desigual	-1,3946	13,8	0,1851
2	8	16,5000	4,0356	1,4268	Igual	-1,4213	16,0	0,1744
Para Ho: Variâncias são iguais, F'= 1,38					DF= 7,9	Prob>F' = 0,6363		

Análise 200. Comparação das taxas de gestação entre os tratamentos no experimento II

Frequência	Positiva	Negativa	Total
1	10	0	10
2	8	2	10
Total	18	2	20

Teste Estatístico	Valor	GL	p
Qui-Quadrado	2,222	1	0,136