

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**DANIEL MENDONÇA DE ARAÚJO LIMA**

**CORRELAÇÃO DOS PARÂMETROS ESPERMÁTICOS COM A FERTILIDADE DE  
DUAS LINHAGENS COMERCIAIS DE SUÍNOS**

**ALEGRE-ES**

**2014**

**CORRELAÇÃO DOS PARÂMETROS ESPERMÁTICOS COM A FERTILIDADE DE  
DUAS LINHAGENS COMERCIAIS DE SUÍNOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Reprodução Animal. Orientador: Professora Doutora Jeanne Broch Siqueira.

**ALEGRE-ES**

**2014**

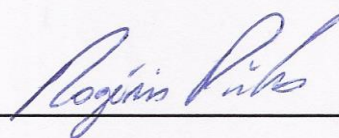
DANIEL MENDONÇA DE ARAÚJO LIMA

**CORRELAÇÃO DOS PARÂMETROS ESPERMÁTICOS COM A FERTILIDADE  
DE DUAS LINHAGENS COMERCIAIS DE SUÍNOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, com requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Reprodução Animal.

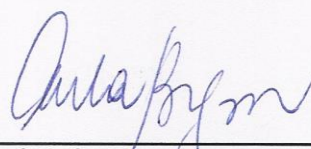
Aprovado em: 27 de fevereiro de 2014

**COMISSÃO EXAMINADORA**



---

Dr. Rogério Oliveira Pinho  
Coorientador  
Universidade Federal Viçosa



---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carla Braga Martins  
Universidade Federal do Espírito Santo

Daniel Mendonça de Araújo Lima

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus que iluminou o meu caminho e sempre proporcionou encontros com pessoas maravilhosas que me ajudaram muito durante esta caminhada;

À professora Jeanne pela orientação e compreensão perante as dificuldades ocasionadas pela distância;

Ao professor José Domingos por sempre estar disposto em ajudar e pela oportunidade de realizar o experimento na Granja de Melhoramento de Suínos (GMS);

À professora Simone pela ajuda em momentos cruciais;

Ao amigo e co-orientador Rogério Pinho pelos ensinamentos e dedicação sempre;

Aos funcionários da GMS em especial ao Sr. José Geraldo, pela transferência de tanto conhecimento;

Aos amigos da GMS em especial ao Hugo, José Carlos e Edinho pela grande ajuda durante o experimento;

A todos os estagiários da GMS que tanto ajudaram durante o experimento;

Aos meus pais Túlio Otávio e Vânia pelos exemplos de amor, trabalho e dedicação;

Aos meus irmãos, Tavinho e Rodrigo pelo apoio;

À minha namorada Carolina pelo companheirismo e grande ajuda na conclusão deste trabalho;

E a todos que colaboraram direta e indiretamente para minha formação pessoal e contribuíram para a realização deste trabalho.

*“... Os homens perdem a saúde para juntar dinheiro, depois perdem o dinheiro para recuperar a saúde. E por pensarem ansiosamente no futuro esquecem o presente de forma que acabam por não viver nem no presente nem no futuro. E vivem como se nunca fossem morrer... e morrem como se nunca tivessem vivido.” Dalai Lama*

## **RESUMO**

MENDONÇA de ARAÚJO LIMA, DANIEL. **Correlação dos Parâmetros Espermáticos com a fertilidade de duas linhagens comerciais de suínos**. 2014. 49p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2014.

Objetivou-se com este trabalho caracterizar o padrão seminal de reprodutores suínos de duas linhagens comerciais e relacionar as avaliações seminais com a taxa de fertilidade dos reprodutores através de inseminações artificiais efetuadas em porcas com diferentes ordens de parto.. O desempenho reprodutivo de quatro varrões de duas linhagens comerciais (A e B) foi obtido por meio de avaliações físicas (motilidade e vigor espermático), morfológicas (defeitos maiores, menores e totais dos espermatozoides) e também por meio de análises complementares para verificar a viabilidade da membrana plasmática (teste supravital e hiposmótico). Durante o período de 10 meses foram inseminadas 322 fêmeas incluindo múltiparas e marrãs. Dentre os quatro machos avaliados, o macho 4 (da linhagem comercial B) esteve no grupo que obteve os melhores resultados no que diz respeito às avaliações espermáticas e com isso, foi o reprodutor que apresentou o melhor desempenho reprodutivo, obtendo  $15,8 \pm 3,2$  leitões nascidos por leitegada. Por outro lado, o macho 1 da linhagem comercial A esteve no grupo que apresentou os piores índices nas avaliações espermáticas, apresentando também o pior desempenho em relação à fertilidade com  $11,7 \pm 2,8$  leitões nascidos por leitegada. Os valores registrados para os testes que avaliam a viabilidade da membrana plasmática dos espermatozoides logo após a diluição (tempo 0h) foram superiores aos registrados para as doses que passaram pelo processo de resfriamento ( $p < 0,05$ ). A motilidade espermática caiu de 84,0% para 78,6% após 12 horas de resfriamento. A integridade física da membrana plasmática avaliada pelo teste supravital caiu de 92,5% para 85,9%, e a atividade bioquímica da membrana plasmática avaliada pelo teste hiposmótico caiu de 87,2% para 76,9% após 12 horas de estocagem. Já o valor referente ao número total de fetos nascidos (14,9) encontrado no tempo (0h) diferenciou ( $p < 0,05$ ) daqueles encontrados após 12, 36 e 60 horas de armazenamento (13,0; 12,5; e 12,6 respectivamente), e foi semelhante ( $p > 0,05$ ) aos encontrados após 24, 48 e 72 horas de armazenamento (14,6; 13,6; e 14,2 respectivamente). Todos os reprodutores apresentaram-se dentro dos limites aceitáveis em relação às anormalidades espermáticas independente do tempo de resfriamento das doses inseminantes. O número total de fetos nascidos não diferiu de acordo com a ordem de parto, entretanto o número de leitões nascidos vivos foi

maior nas classes de ordem de parto 2 e 3, onde estavam presentes as porcas de 2º ao 5º parto.

Palavras-chave: Fertilidade; Suíno; Testes complementares

## **ABSTRACT**

MENDONÇA de ARAÚJO LIMA, DANIEL. **Sperm parameters and fertility rate of**



**females of a Commercial Pig Line.** 2014 49p. Dissertation (Master in Veterinary Science) - Center for Agricultural Sciences, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2014.

The aim of this study was to characterize the seminal pattern of two boars of two commercial pig lines and correlate the seminal evaluations with the fertility rate of them through artificial inseminations. The reproductive performance of the four boars from two commercial lines (A and B), was obtained through physical assessments (motility, vigor), morphological and also through additional analyzes to verify the feasibility of the plasma membrane (supravital and hypoosmotic test). During the period of 10 months 322 females were inseminated, including gilts and sows. Among the four boars evaluated, the boar 4 (the second of commercial line B) was in the group that got the best results regarding to spermatic evaluations and due to this was the boar who had the best reproductive performance, achieving  $15.8 \pm 3.2$  piglets per litter. On the other hand, the boar one (the first of commercial line A) was in the group with the worst rates in sperm evaluations showing the worst performance in relation to fertility with  $11.7 \pm 2.8$  piglets per litter. The values found in tests assessing the viability of the sperm plasma membrane immediately after dilution (time 0h) were higher than those found in the doses that passed through cooling ( $p < 0.05$ ) process. The motility decreased from 84.0% to 78.6% after 12 hours of cooling. The physical integrity of the plasma membrane assessed by supravital test dropped from 92.5% to 85.9%, and the biochemical activity of plasma membrane evaluated by hypoosmotic test dropped from 87.2% to 76.9% after 12 hours of storage. The value for the total number of fetuses born (14.9) found in time (0h) differed ( $p < 0.05$ ) than those found after 12, 36 and 60 hours of storage (13.0, 12.5, and 12.6 respectively) and was similar ( $p > 0.05$ ) to those found after 24, 48 and 72 hours of storage (14.6, 13.6, and 14.2 respectively). All boars present themselves within acceptable limits in relation to abnormal sperm independent of cooling time of insemination doses. The total number of piglets was not different according to the parity order, however the number of piglets born alive was higher in classes of parity order 2 and 3, which were present gilts of 2nd to 5th parity.

Key-words: Additional testing; Fertility; Pig

## SUMÁRIO

	Página
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>

<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>3</b>
2.1. Ciclo estral e detecção do estro .....	3
2.2. Inseminação Artificial (IA) .....	5
2.3. Importância do Macho na Suinocultura .....	8
2.4. Avaliação Seminal .....	10
2.4.1. Membrana Plasmática .....	12
2.4.2. Diluentes.....	13
2.4.3. Avaliações rotineiras da célula espermática.....	15
2.4.3. Testes Complementares.....	17
<b>3. METODOOGIA.....</b>	<b>20</b>
3.1. Local do experimento.....	20
3.2. Animais.....	20
3.3. Coletas de dados.....	21
3.3.1. Porcas.....	21
3.3.2. Varrões.....	21
3.3.3. Leitões.....	23
3.4. Análise estatísticas.....	23
<b>4. RESULTADO E DISCUSSÕES.....</b>	<b>25</b>
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>40</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>41</b>
<b>7. ANEXO.....</b>	<b>51</b>

# 1. INTRODUÇÃO

Na suinocultura, os reprodutores são animais de grande valor, fundamentalmente por representarem o material genético disponível para a produção de leitões, e por esta razão deve-se estar atento para que não haja influência direta dos machos sobre as taxas de fertilidade do rebanho (GAGGINI et al., 2008).

Neste sentido, desde o início do século XXI, cientistas têm procurado intensamente desenvolver ensaios laboratoriais para predizer a fertilidade do sêmen. Contudo, tais metas têm sido de difícil obtenção, uma vez que a maior parte dos problemas reside nos diferentes atributos que os espermatozoides devem possuir para fertilizar o ovócito (ARRUDA et al., 2011).

Desta forma, a motilidade, o vigor, a concentração e a morfologia espermáticas são considerados os parâmetros clássicos na avaliação de amostras de sêmen (*in natura*, resfriado ou congelado) (ARRUDA et al., 2011).

Um dos principais parâmetros a ser considerado na avaliação da fertilidade do macho, ou na análise dos métodos de preservação espermática, é o estudo da viabilidade dos espermatozoides (PINTADO et al., 2000), sendo que testes para avaliar a integridade da membrana plasmática do espermatozoide incluem a permeabilidade a corantes e a análise da função bioquímica, cujos resultados variam de acordo com o método utilizado (BRITO et al., 2003).

A integridade da membrana plasmática é um requisito essencial para o metabolismo e função espermática e ainda pode ser avaliada com a coloração eosina-nigrosina ou com uso de sondas fluorescentes (BERNARDI, 2008). Já o teste hiposmótico foi desenvolvido para avaliar a atividade bioquímica da membrana plasmática (TAKAHASHI et al., 1990, REVELL e MRODE, 1994).

Considerando que a qualidade do sêmen é de grande importância para a inseminação artificial (IA) das porcas e, conseqüente, a produção de um número ótimo de leitões, os testes complementares (parâmetros seminais) podem ser correlacionados com o número de leitões nascidos a partir da técnica de IA. Desta forma, objetivou-se com este estudo caracterizar o padrão seminal de reprodutores

suínos de duas linhagens comerciais e relacionar as avaliações seminais com a taxa de fertilidade dos reprodutores através de inseminações artificiais efetuadas em porcas com diferentes ordens de parto.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Ciclo estral e detecção do estro

Ao atingirem a puberdade as fêmeas começam a manifestar mudanças comportamentais (inquietação, monta sobre outros animais, aceitação à monta) e anatómicas (edema e hiperemia da vulva) caracterizando então, o primeiro cio (HAFEZ e HAFEZ, 2004). Assim que atinge a maturidade sexual, o ciclo estral na espécie suína tem duração média de 21 dias e está dividido em quatro fases distintas: proestro, estro ou cio, metaestro e diestro.

O proestro é a fase em que ocorre o crescimento e a maturação dos folículos ovarianos pela ação do FSH e tem duração média de três dias. Durante essa fase, a concentração de LH está baixa na circulação e a progesterona está em declínio devido à lise do corpo lúteo proveniente do ciclo anterior. Nessa etapa inicia-se a produção de estrógeno pelos folículos em desenvolvimento, os quais, ao atingirem o estágio de maturação, desenvolvem o pico de estrógeno na corrente circulatória, o que estimula os centros hipotalâmicos a provocar uma descarga abrupta de LH hipofisário (feed back positivo). Em consequência, ocorre o estímulo da ovulação pelos folículos, caracterizando a fase do estro (ALVARENGA et al., 2011).

É durante o período do estro que se dá a ovulação. Consiste na libertação de vários gametas femininos depois da ruptura dos folículos de Graaf. A duração do estro é variável, mas geralmente nas primíparas dura cerca de 38 horas e nas múltiparas perto de 53 horas (NOAKES et al., 2001).

Após a ovulação, as concentrações de estrógeno diminuem na corrente circulatória e inicia-se a produção de progesterona pelos corpos lúteos. Essa fase caracteriza o metaestro, na qual os corpos hemorrágicos formados por ocasião da ovulação são transformados em corpos lúteos (CL) pela ação do LH. Esta fase tem duração aproximada de dois dias. Quando a progesterona atinge seu platô, inicia-se a fase de diestro, que é a fase mais longa do ciclo estral, com duração média de 14 dias. Esta fase caracteriza-se pela presença de CL maduros produzindo progesterona, que inibem ou diminuem a secreção de FSH e LH hipofisário (feed back negativo). Se ocorrer a fertilização, os CL persistem durante toda a gestação,

do contrário, o endométrio produz a PGF2 $\alpha$  (prostaglandina F2  $\alpha$ ) que provoca a lise ou destruição dos CL e a fêmea inicia um novo ciclo estral (LIMA et al, 1999).

Durante a lactação, a maioria das fêmeas não manifesta estro devido ao bloqueio do eixo reprodutivo, desencadeado pelas mamadas e pela presença dos leitões. Este período denomina-se de anestro lactacional. Entretanto, com a retirada dos leitões, todos os fatores bloqueadores cessam e a fêmea retorna ao estro (MELLAGI, 2011). Desta forma, no período após o desmame, é recomendado o contato com o macho, duas vezes ao dia, a partir do primeiro dia, com contato focinho-focinho. O objetivo é induzir a manifestação do estro e identificação com maior precisão o seu início (DALLANORA et al., 2004).

A partir do diagnóstico do início do estro será determinado o momento no qual a fêmea deverá ser coberta ou inseminada. Portanto é fundamental a realização de um diagnóstico eficiente, determinando com a maior precisão possível, o momento no qual a fêmea está iniciando o estro (MELLAGI, 2011).

Segundo Borchardt et al. (2005) o diagnóstico de estro compreende três fases. A primeira etapa compreende a identificação das fêmeas que apresentam modificações anatômicas, como edema e hiperemia vulvar e alterações comportamentais como inquietude e falta de apetite. A segunda fase é a estimulação das fêmeas pela exposição ao macho sexualmente maduro e com boa libido. Nessa fase é necessário que cada fêmea tenha contato focinho-focinho por 1-2 minutos. Com a presença do macho, deve se realizar a terceira etapa que o reflexo de tolerância à pressão lombar, pressão exercida pelo responsável pela identificação do estro no dorso da porca. Se após a pressão esta ficar imóvel é confirmado o estro.

A receptividade sexual da fêmea dura entre as 40 e 60 horas, sendo que a duração do estro puberal normalmente é mais curto (47 horas) do que a duração dos seguintes (56 horas). Os ovócitos são libertados entre as 38 e 42 horas após o início do estro e a duração do processo ovulatório dura cerca de 3,8 horas, entre 40 a 48 horas após o pico de LH. Durante a fase luteínica e início da fase folicular poderá haver até 50 pequenos folículos, embora nas fases do pro-estro só 10 a 20 folículos atinjam o tamanho pré-ovulatório (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

Segundo Silveira (2004), a ovulação tem sua ocorrência estimada na fêmea nulípara de 24 a 36h e na múltipara de 33 a 39h, após o reflexo de imobilização da fêmea, embora esteja evidente que existe uma grande variação associada ao momento ovulatório.

Como não é possível prever o momento da ovulação, detectar o início do estro é essencial para planejar os protocolos de IA a serem aplicados. As falhas no diagnóstico do estro podem trazer sérios problemas no desenvolvimento dos programas de IA e no desempenho reprodutivo do plantel (MELLAGI, 2011).

## **2.2. Inseminação artificial**

A inseminação artificial (IA) é definida como o ato de depositar, por meios instrumentais, o sêmen no sistema genital da fêmea, em condições que favoreçam os espermatozoides a encontrar o ovócito e fecundá-lo. Assim, é uma técnica que permite a aceleração dos benefícios advindos do melhoramento genético, já que o patrimônio genético dos melhores machos pode ser utilizado de forma mais eficiente se difundindo para um maior número de fêmeas (BRAZ, 2003).

As primeiras tentativas de IA em suínos foram desenvolvidas na Rússia por Ivanov, em 1926 e 1927, e continuadas por Milovanov e colaboradores entre 1930 e 1936 (JOHNSON et al., 2000). Em 1931, as granjas da Rússia começaram a utilizar a IA em seus rebanhos (LEVIS, 2000). No Brasil, a IA foi implantada em 1975 com a instalação de duas centrais de inseminação artificial (CIAs), uma em Estrela-RS e outra em Concórdia-SC.

Nos últimos anos a IA em suínos tem evoluído consideravelmente, sendo isto acompanhado do intenso melhoramento genético dos animais, o que têm promovido melhores resultados de fertilidade nos rebanhos. As biotecnologias da reprodução dos animais domésticos têm melhorado significativamente as taxas de produção através da seleção de indivíduos com alto valor genético (MACEDO et al., 2011). Na espécie suína, a IA trouxe benefícios pelo melhor aproveitamento de machos geneticamente superiores e também pela difusão rápida de características desejáveis no rebanho como: melhor de ganho de peso levando a uma melhor conversão alimentar; menor deposição de gordura e melhor qualidade de carcaça, (BORTOLOZZO et al., 2005a).

Atualmente, a pesquisa em IA na espécie suína está direcionada a três grandes áreas: progressos na conservação do sêmen, momento ideal para realização da deposição espermática no trato genital feminino e redução do número de espermatozoides/fêmea/ano (BORTOLOZZO et al., 2005a).

O que se define nos protocolos de inseminação artificial são frequência e momento ideal para ser realizada. Para que seja alcançado um melhor desempenho reprodutivo, a IA deve ser realizada, de preferência, até 24 horas antes do momento da ovulação sendo recomendado o uso de duas ou mais inseminações, durante um mesmo estro (AFONSO et al, 2001). Segundo Bortolozzo et al. (2005b), os espermatozoides depositados no útero permanecem viáveis para fecundar os ovócitos por 16-24 horas. Já os ovócitos permanecem viáveis por um período de 4-8 horas. Baseado nesses períodos de viabilidade dos gametas, os melhores resultados são obtidos quando a IA é realizada próximo ao momento da ovulação. Como há dificuldade em estabelecer o momento exato da ovulação, preconiza-se que as inseminações sejam repetidas em intervalos de 24 horas, podendo este intervalo variar de acordo com o protocolo de inseminação.

A maioria das fêmeas recebe pelo menos uma inseminação pré-ovulatória. Entretanto, cabe salientar que há fêmeas com estro curto, que ovulam precocemente, e que podem ocorrer falhas na detecção do início do estro. Nestes casos, algumas fêmeas recebem a primeira dose inseminante após a ovulação, podendo prejudicar os índices de fertilidade (BORTOLOZZO et al., 2005b).

A IA na espécie suína é uma técnica já bem estabelecida na rotina das centrais de produção, porém, para serem alcançados lucros é fundamental cada vez mais seu aperfeiçoamento. Assim, a pesquisa nessa área tem buscado reduzir os custos com cobertura e potencializar o emprego dos machos geneticamente superiores, destacando-se pesquisas que buscam desenvolver protocolos de IA utilizando um reduzido número de espermatozoides/fêmea/ano. Desta maneira, a dose inseminante contendo cerca de 3 bilhões de espermatozoides tem substituído com êxito o número de espermatozoides depositados no trato genital da fêmea durante a monta natural, que chega a ser de 50 a 70 bilhões de espermatozoides, permitindo assim um melhor aproveitamento do ejaculado (MATOS et al, 2008b).

Com a IA, apenas um macho é responsável pela inseminação de 100 a 200 matrizes, isto é, 10 a 15 vezes mais do que quando as matrizes são cobertas pelo processo de monta natural. Assim, a escolha de um bom reprodutor está relacionada diretamente aos altos índices reprodutivos da granja (GAGGINI et al., 2008).

Para a manutenção do desempenho reprodutivo é necessário que certos cuidados sejam tomados. A manipulação do ejaculado nas centrais, desde a coleta até o armazenamento, deve obedecer a padrões rigorosos de higiene e avaliação,



bem como a taxa de diluição das doses. Os ejaculados devem ser avaliados com vistas a diferenciar machos sub-férteis, visando um possível descarte dos mesmos (BORTOLOZZO, et al., 2008).

O emprego de materiais descartáveis, desde a coleta até a infusão da dose inseminante, proporciona um menor índice de contaminação do sêmen, tanto biológica (bactérias) como química (resíduos de detergente provenientes da lavagem, por exemplo), melhorando a qualidade da dose inseminante. Os sacos de coleta colocados no copo coletor ou o uso de copos descartáveis, luvas de coleta, garrafas e bisnagas, pipetas de IA, enfim, praticamente todos os materiais utilizados na produção, armazenamento e aplicação da dose inseminante existem, disponíveis no mercado, sob a forma descartável e a preços acessíveis (BORTOLOZZO, et al., 2002).

O método tradicionalmente empregado na IA em suínos preconiza a utilização de uma pipeta, que mimetiza a extremidade do pênis do cachaço, permitindo a deposição do sêmen no canal cervical. Para realizar a IA, é muito importante a presença de um macho adulto alocado na frente da fêmea, estimulando-a através dos estímulos tácteis, auditivo, visual e dos ferormônios durante todo o tempo de inseminação. O procedimento sequencial inicia-se com a limpeza a seco da vulva e introdução da pipeta de inseminação, previamente umedecida com algumas gotas da dose inseminante, no sentido dorso-cranial com um movimento rotatório no sentido anti-horário. Após fixar a pipeta na cérvix é realizada a infusão da dose inseminante. Esse procedimento deve ter uma duração aproximada de 3 a 5 minutos, sempre com a constante presença do cachaço e estímulo focinho com focinho (WATSON e BEHAN, 2002).

Com o avanço da técnica de IA, o impacto da fertilidade de um doador de sêmen sobre o desempenho reprodutivo do plantel é relevante e a seleção ou descarte de um reprodutor exige a combinação de exames clínicos e laboratoriais (FOXCROFT et al., 2008). Contudo, o treinamento e a reciclagem continuada das pessoas envolvidas no processo, a fiscalização periódica dos procedimentos rotineiros da técnica, o diagnóstico adequado do estro, a qualidade da dose inseminante são aspectos fundamentais para a aplicação desta tecnologia com obtenção de resultados economicamente viáveis (BORTOLOZZO et al., 2005b).

### **2.3. Importância do macho na suinocultura**

O processo reprodutivo na espécie suína é de fundamental importância, não só para a perpetuação da espécie, mas principalmente por ser fator decisivo no desempenho econômico da atividade suinícola. Atualmente, sabe-se que não bastam apenas bons padrões nutricionais e boas práticas de manejo no plantel como um todo. É necessário também que os índices reprodutivos sejam elevados, o que faz com que uma atenção especial seja dada ao plantel de reprodutores, já que estes estão diretamente ligados à produtividade dessa atividade. Portanto, para a obtenção de bons índices reprodutivos em uma granja é de extrema importância o monitoramento de todos os fatores que possam influenciar o desempenho reprodutivo tanto da fêmea como do macho (ALVARENGA et al., 2011).

Por isso é importante conhecer algumas características do cachaço a ser utilizado na reprodução. A idade deve ser superior a 10 meses, quando o macho já está sexualmente maduro. Nessa idade, o reprodutor já tem suficiente produção e liberação de ferormônios, sendo mais eficiente na estimulação das leitoas. Além da eficiência na estimulação da puberdade, o macho mais velho tem um maior desenvolvimento corporal que as fêmeas. Ao entrar na baia, impõe sua presença, evitando a agressão por parte das leitoas. Quando são usados machos mais novos, é comum observar brigas entre o macho e as fêmeas, devido ao menor tamanho e falta de diferentes odores/cheiros. O cachaço deve ser saudável, principalmente no que se refere à saúde do aparelho locomotor e reprodutivo (MELLAGI, 2011).

Existem vários momentos na rotina de uma granja que o macho deve estar presente, como indução da puberdade em leitoas, detecção de estro nas fêmeas desmamadas, detecção de estro após abortamentos e retornos, e durante a inseminação artificial. O macho é indispensável para antecipar e/ou desencadear uma série de hormônios nas fêmeas, facilitando o manejo da equipe responsável por estes setores e melhorando os índices de cobertura (MELLAGI, 2011).

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

Existe uma grande variabilidade entre varrões no que se refere a várias características importantes de produtividade nas centrais de IA. Dentre elas, vale

salientar a idade à puberdade, libido e treinamento para a coleta, bem como as características de resistência das células espermáticas aos processos de resfriamento e congelamento. Além das diferenças entre indivíduos, observam-se diferenças entre raças, entre varrões de raças puras e cruzados e, finalmente, entre linhas genéticas (SONDERMAN e LUEBBE, 2008).

As informações essenciais para diagnosticar a causa dos baixos índices de fertilidade incluem: presença de doenças (ou histórico de doenças), idade (com relação à experiência sexual), quando iniciou o problema, frequência de utilização, condições do local de cobertura, se há recusa em realizar a monta, experiência do funcionário que maneja o macho e ainda aspectos sociais, de comportamento, físicos e climáticos. A avaliação do sistema reprodutivo do macho, além dos fatores acima citados, incluem: análise morfo-fisiológica dos órgãos reprodutivos e ainda avaliação das características físicas do sêmen (LEVIS, 1997).

Desta forma, a habilidade de montar e produzir ejaculados férteis são componentes importantes na decisão de utilizar um macho na reprodução (FERREIRA et al., 2005). Deste modo, a avaliação da qualidade seminal é uma das avaliações importantes para a seleção de machos suínos destinados à reprodução. Por esta razão, os métodos para avaliar a qualidade do sêmen antes de um varrão começar a sua vida reprodutiva, ou antes da utilização de seu sêmen para IA, são necessárias para poder predizer o seu “potencial de fertilidade” (ANDRADE, 2007).

Ao se avaliar a taxa de parto e o tamanho da leitegada proveniente de IA é possível analisar o desempenho reprodutivo do cachaço (DYCK et al., 2011). Porém, o alto custo para testar a fertilidade *in vivo* e a demora em obter a informação a respeito da fertilidade dos machos tem impulsionado estudos que buscam métodos de avaliação *in vitro*. Entretanto, os resultados encontrados tem sido controversos e poucos trabalhos têm detectado valores altos de correlação entre características seminais e a fertilidade *in vivo* (BROEKHUIJSE et al., 2011).

Devido ao crescente aumento na utilização da IA na suinocultura, há interesse na identificação de machos com fertilidade subótima (HIRAI, 2001) para descartá-los ou reduzir seu uso (BERNARDI, 2008). Com isso, a avaliação rotineira dos ejaculados suínos para a preparação de doses inseminantes tem resultado em garantia de qualidade principalmente em termos de motilidade e morfologia espermática. Esta avaliação não traz informações a respeito do número mínimo de espermatozoides necessários para atingir o máximo de fertilidade, do tempo que o

sêmen mantém a sua capacidade fecundante ou da taxa de prenhez e tamanho de leitegada que podem ser alcançados com as amostras de sêmen avaliadas (COLENBRANDER, 2000).

A fertilidade do reprodutor pode ser afetada por diversos fatores, entre estes podem ser citados: os fatores espermáticos associados ao reprodutor e ao processamento do ejaculado, fatores genéticos e fatores relacionados à qualidade da matriz inseminada e do processo de inseminação (KUMMER, 2012).

Sabe-se que o tamanho da leitegada pode variar entre cachacos quando o mesmo número de espermatozoides é empregado na dose (FLOWERS, 2002). De acordo com Foxcroft et al. (2008), esta informação permite comparar o potencial reprodutivo de cachacos submetidos a uma avaliação *in vivo*. Segundo estes autores, nesta metodologia comparam-se os resultados referentes à taxa de parto e ao número de nascidos totais entre diferentes cachacos submetidos ao mesmo protocolo de inseminação artificial e critério de avaliação laboratorial do ejaculado.

A certificação da fertilidade dos reprodutores e o uso de tecnologias na avaliação espermática para a garantia da qualidade da dose inseminante são imprescindíveis, para não haver quedas na produtividade quando essas estratégias forem utilizadas (KUMMER, 2012).

#### **2.4. Avaliação seminal**

O ejaculado do varrão é uma suspensão de espermatozoides em um fluido (plasma seminal) composto de uma mistura de conteúdos da cauda do ducto epididimal e secreções das glândulas acessórias. O ejaculado é então composto de uma série de frações usualmente chamada pré-esperma (dominada pela secreção uretral, das glândulas bulbouretrais bem como da próstata), fração rica (no qual contém grande quantidade de espermatozoides) e fração pobre (que contém menos espermatozoides). A maior parte dos espermatozoides ejaculados (80-90%) estão presentes na fração rica do ejaculado, sendo portanto a fração preferencial a ser a coletada para o processamento do sêmen visando-se a inseminação artificial. Além disso, o número de espermatozoides liberados nessa fração é desigual, sendo que a maioria dos espermatozoides ejaculados estão presentes nos primeiros 10-15 mL da fração rica (RODRIGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2005). A fração gelatinosa que coagula

o plasma seminal como observado após a ejaculação serve *in vivo* para reter o ejaculado no útero também minimizando o refluxo através da cérvix (RODRIGUEZ-MARTINEZ et al., 2005).

O sêmen suíno, dentre outras espécies de mamíferos é o mais sensível a flutuações de temperatura (CORRÊA et al., 2001). A temperatura ideal para a manutenção das doses inseminantes situa-se entre 15 e 18 °C. Queda de temperatura abaixo de 15 °C é causa de choque térmico, que resulta em perda irreversível da motilidade espermática e lesões na estrutura das células. Temperatura acima dos 18 °C, por outro lado, são negativas por não reduzirem de forma eficiente o metabolismo dos espermatozoides e facilitam a multiplicação de bactérias, que agem negativamente sobre a qualidade do sêmen (SCHEID, 2003).

Estudos têm sido realizados na busca de determinar métodos de avaliação de sêmen mais eficientes, ou seja, que apresentam maior correlação entre os resultados obtidos nas avaliações *in vitro* com o desempenho *in vivo* (SARAVIA et al., 2005). As avaliações *in vitro* dos ejaculados não demonstram boa correlação, na maioria dos casos, com os resultados *in vivo*, especialmente quando utilizados de forma isolada. Isso se deve a dificuldade de reproduzir *in vitro* todos os eventos fisiológicos relacionados à fertilização (TSAKMAKIDIS et al., 2010). Além disso, a viabilidade dos espermatozoides é determinada por fatores relacionados com sua fisiologia e bioquímica, e por variações na anatomia do sistema reprodutor feminino e pelo transporte espermático no seu interior (HOLT, 2000). Portanto, as avaliações de qualidade seminal devem considerar a necessidade de armazenamento dos gametas *in vitro* e a sua sobrevivência *in vivo*.

Considerando a heterogeneidade presente na população de espermatozoides em um ejaculado tanto em relação à morfologia como sobre sua função penetrante, apenas uma pequena proporção tem o potencial para fertilizar (WABERSKI et al., 2008). Ainda, o seu potencial fertilizante pode variar em função de vários fatores, como as estações do ano, as linhagens e a idade dos reprodutores e a frequência das coletas de sêmen (BOLARÍN et al., 2009). Dessa forma, a associação de diferentes métodos de avaliação de qualidade seminal poderá agregar mais informações sobre estimativas da fertilidade dos machos, não apenas detectando os machos sub-férteis, mas também diferenciando de forma mais precisa os indivíduos com níveis distintos de fertilidade (WABERSKI et al., 2008).

Portanto é quase impossível avaliar a célula espermática na forma como foi ejaculada, visto que, para a inseminação artificial propriamente dita ou para a realização dos testes, os espermatozoides são submetidos a uma série de manipulações. Além da diluição e resfriamento, vários procedimentos usados nos testes podem, por si só, modificar a função espermática por possíveis danos às membranas espermáticas (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2006).

#### *2.4.1. Membrana Plasmática*

O espermatozoide é composto de muitas estruturas que, se afetadas, comprometem a capacidade de fecundação, em especial, as membranas plasmática e acrossomal são fundamentais durante a capacitação espermática, sendo limitante sua integridade estrutural e funcional (SALVINO, et al., 2011).

As membranas biológicas são estruturas laminares, assimétricas, constituídas por lipídeos e proteínas aos quais se ligam os glicídeos. A sua integridade estrutural se deve às propriedades dos lipídeos constituintes, às proteínas que são as principais responsáveis pela ocorrência da maioria dos processos dinâmicos, e aos carboidratos, que desempenham importante papel nas interações entre células (STRYER et al., 2004).

As membranas espermáticas são estruturas especializadas e exercem funções fundamentais na fecundação. Durante a maturação espermática, no epidídimo, ocorrem modificações tanto na superfície celular quanto no interior da membrana, caracterizadas pela alteração de sua fluidez, permeabilidade e mobilidade das proteínas integrais (WATSON, 1995).

A membrana plasmática (ou celular) engloba a célula, definindo seus limites, separa o meio intracelular do extracelular e é a principal responsável pelo controle da saída e entrada de substâncias da célula (BERNARDI, 2008) e é formada por uma fina película de moléculas de lipídeos e proteínas e é polarizada dentro de três segmentos: cabeça, peça intermediária e cauda (SALVIANO, et al., 2011).

As membranas biológicas também oferecem diferentes permeabilidades frente a diferentes solutos, sendo, por esta razão, frequentemente classificadas como semipermeáveis, pois permitem que algumas moléculas pequenas passem através delas, embora impeçam que grandes moléculas façam o mesmo (STEN-KNUDSEN, 2002). Em condições de estresse, como no caso de redução da

temperatura, as membranas podem sofrer rearranjos formando pontos vulneráveis induzindo a excessiva permeabilidade ou rompimento, também podendo ocorrer a transição dos lipídeos, o que altera o seu estado funcional (HOLT, 2000). Portanto, a integridade da membrana plasmática é de fundamental importância para função espermática, pois somente uma célula intacta é capaz de sofrer determinados mecanismos fisiológicos no trato reprodutivo da fêmea, alterações que permitirão os processos de capacitação e reação acrossômica, fundamentais para a fecundação do ovócito (WABERSKI et al., 2008).

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

#### *2.4.2. Diluentes*

A manutenção do sêmen suíno sob condições de refrigeração é uma técnica eficaz para a difusão do material genético por meio dos programas de IA. Quando o ejaculado é processado de forma adequada é possível obter resultados de prenhez e tamanho de leitegada semelhante aos obtidos na monta natural (BORTOLLOZO et al., 2005b).

A estocagem de sêmen diluído a baixas temperaturas tem sido um método utilizado para prolongar a viabilidade dos espermatozoides ejaculados devido ao seu efeito de desaceleração dos processos metabólicos celulares, prolongando a viabilidade espermática pela redução do consumo de energia e formação de bioproduto (MATOS, 2008a).

A grande difusão da IA, utilizando sêmen resfriado na espécie suína, se deu graças ao desenvolvimento de diluidores que permitem a conservação do sêmen por prolongados períodos de tempo e com fertilidade adequada. O diluidor, diluente ou extensor é definido como uma solução aquosa que permite um aumento no volume do ejaculado até uma quantidade necessária para a distribuição das doses

inseminantes, enquanto preserva a função espermática e mantém a fertilidade satisfatória (GADEA, 2003).

Diluentes para sêmen vêm sendo usados há muito tempo. Inicialmente, eram soluções simples e não permitiam uma boa conservação espermática, gradativamente foram sendo modificados com o passar do tempo e o desenvolvimento da IA. Diversos diluentes encontrados no mercado são fruto da soma de conhecimentos oriundos de vários grupos de pesquisa, que foram sendo estruturados de acordo com as necessidades das células espermáticas e de manter a viabilidade quando conservados por refrigeração (SÁNCHEZ, 2003).

O diluente utilizado na inseminação é uma composição bioquímica para dar equilíbrio fisiológico, bioquímico e biofísico aos espermatozoides e ao ambiente, assim ele é composto por uma ampla variedade de substâncias quimicamente diferentes entre si como glicose, antibiótico, sais, dentre outras, que tem como finalidade aumentar o volume do sêmen, proteger o espermatozoide contra choque térmico, fornecer substratos necessários ao metabolismo espermático, manter o pH e inibir o crescimento bacteriano, mantendo assim a viabilidade dos espermatozoides até o momento de serem introduzidos no trato reprodutivo da fêmea (CORRÊA et al., 2001). Entretanto, todo este sistema metabólico criado artificialmente apresenta um curto período de funcionamento, ou seja, à medida que os componentes vão sendo utilizados, produtos de degradação são formados, o meio sofre alterações, levando as células ao envelhecendo e perdendo a viabilidade (BARROS, 2010).

Os diluentes podem ser classificados quanto ao seu tempo de armazenamento como de longa duração, que prolongam a vida dos espermatozoides por cinco dias ou mais, sendo usados quando o sêmen é armazenado por períodos maiores ou transportado por longas distâncias, ou de curta duração, que preservam a viabilidade da célula espermática por até três dias. Assim, a escolha do meio diluente deve considerar as condições em que a inseminação artificial irá ocorrer, o tempo que normalmente decorre entre o processamento das doses e a IA, ou seja, se o sêmen se destina ao uso imediato ou armazenamento durante alguns dias (BORTOLOZZO et al., 2005b). Contudo, quando a dose de sêmen é armazenada por períodos superiores a 72h, mesmo com o emprego de diluentes de longa duração, os parâmetros reprodutivos, como a taxa de parto (TP) e o tamanho da leitegada podem ser afetados (WEITZE, 1991).



Embora o BTS seja considerado um diluente de curta duração, Reis et al. (2000) observaram que, para alguns machos, a motilidade esteve próxima de 60% até 168h de armazenamento. Da mesma forma, ao avaliar ejaculados oriundos de oito machos, diluídos em BTS e mantidos a 15°C, Ohata (2001) também constatou valores de motilidade superiores a 60%, para alguns machos, após 96h de armazenamento. Conforme preconizado pelo CBRA (1997), de uma maneira geral, todas as doses mantiveram uma motilidade aceitável, superior a 50% durante as 72 horas de armazenamento e, assim não causaram grandes variações no número total de fetos nascidos.

A manutenção da viabilidade do sêmen desde a coleta até sua utilização é um ponto crítico dentro de um programa de inseminação artificial. Mesmo nos programas internos com produção das doses dentro da granja, podem ser verificadas falhas nesta etapa do processo. Condições inadequadas de armazenamento e transporte afetam de forma negativa a qualidade do sêmen. O sêmen deve ser considerado como um produto perecível, precisando ser armazenado e transportado em condições bem controladas, de maneira a poder preservar suas características iniciais (SCHEID, 2003).

#### *2.4.3. Avaliações rotineiras da célula espermática*

A avaliação do sêmen é classicamente realizada considerando-se os aspectos físicos (volume, coloração, aspecto do sêmen, motilidade espermática progressiva retilínea, vigor e concentração espermáticas) e morfológicos dos espermatozoides (anormalidades espermáticas) (Colégio Brasileiro de Reprodução Animal - CBRA, 1998).

Uma forma simples, rápida e eficaz de se avaliar o ejaculado consiste no exame de motilidade. Este parâmetro está intimamente relacionado à viabilidade, ou seja, a percentagem de células móveis é altamente correlacionada com a quantidade de espermatozoides vivos ou viáveis, apesar de nem sempre representar uma correlação significativa com a fertilidade. A motilidade espermática, atributo importante para o deslocamento espermático no trato reprodutivo e para a penetração no ovócito, diz respeito ao percentual de espermatozoides móveis numa amostra, enquanto, o vigor, refere-se à força de deslocamento, em uma escala de 0

a 5, onde 0 significa espermatozoides sem motilidade e 5, espermatozoides com deslocamento rápido, progressivo e retilíneo (GRANEMANN, 2006).

A concentração espermática representa o número de espermatozoides por milímetro ou centímetro cúbico no ejaculado, podendo apresentar variação, tanto entre raças, como num mesmo animal, dependendo da frequência de utilização desse macho para reprodução (SILVA, 2003). O procedimento mais comum para se obter a concentração espermática consiste na contagem das células na câmara de Neubauer (CBRA, 1998).

Análise morfológica do sêmen é um parâmetro importante de qualidade e, de modo geral, permite descartar ejaculados ou machos que ultrapassam um determinado nível de anormalidades (ARRUDA, 2011).

Tentativas ao longo dos anos foram feitas no intuito de quantificar as alterações morfológicas e estabelecer sua relação com a fertilidade nos animais, e a espécie com maior número de trabalhos desenvolvidos foi a bovina, devido ao grande interesse econômico. Blom (1950) propôs uma classificação dos defeitos espermáticos em primários e secundários, Segundo o autor, “primárias” seriam geradas durante a espermatogênese, e a “secundária” durante a maturação espermática. Dott (1975), trabalhando com sêmen de garanhão, acrescentou nesta classificação anormalidades terciárias (artefato de técnica), ou seja, por danos induzidos ao espermatozoide durante a manipulação pós colheita.

Rao (1971), ao trabalhar com touros normais e com problemas clínicos reprodutivos, não conseguiu enquadrar as alterações morfológicas encontradas no sêmen desses touros na classificação de defeitos primários e secundários, o que levou à contestação da classificação feita por Blom (1950). Blom (1973) refez sua classificação original e agrupou as alterações em defeitos maiores e defeitos menores, sendo que a alteração morfológica é classificada de acordo com o potencial de seu efeito sobre a fertilidade de touros.

Nishikawa (1959), na avaliação de sêmen de jumentos e de garanhão, classificou as alterações morfológicas de acordo com seu local de alteração: cabeça, peça intermediária e cauda. No Brasil, conforme as normas do CBRA (1998), na avaliação andrológica de reprodutores de todas as espécies, a classificação das anormalidades espermáticas deve ser agrupada em defeitos maiores e defeitos menores, baseados na classificação de Blom (1973).

#### 2.4.4. Testes Complementares

Características espermáticas padrão (concentração, motilidade e morfologia) são frequentemente insuficientes, por si só, para o diagnóstico de fertilidade/infertilidade, a não ser que individualmente sejam muito diferentes dos valores da normalidade para a espécie (MELO et al., 2005).

##### *Teste hiposmótico*

Osmose é o fenômeno observado quando uma solução é separada de um solvente por uma membrana permeável, e consiste na difusão do solvente de uma concentração menor para uma maior, através desta membrana semipermeável. A pressão osmótica é a pressão aplicada ao compartimento hiperosmótico para prevenir o movimento do solvente (ALKMIN, 2010).

Um aumento da pressão osmótica de uma solução pode ser acompanhado por uma variação na concentração de íons nessa solução. Em geral, o choque osmótico afeta a difusão de fosfolípidios na dupla camada da membrana do espermatozoide (CHRISTOVA et al., 2002), enquanto um aumento na pressão osmótica do meio, reduz a motilidade espermática e causa danos ao acrossoma (LIU e FOOTE, 1998).

Durante o processamento do ejaculado, a osmolaridade e a qualidade do diluente estão entre os principais fatores que devem ser controlados para evitar danos à célula espermática. A pressão osmótica do sêmen oscila entre 210 a 290 mOsm (LEVIS, 2000). Esta é mantida no ejaculado diluído, principalmente, por componentes não iônicos, como a glicose (JOHNSON et al., 2000). Íons inorgânicos, como o cloreto de potássio e o cloreto de sódio são acrescentados na composição do diluente para balancear a pressão osmótica (LEVIS, 2000)

A habilidade do teste hiposmótico em avaliar a integridade funcional da membrana plasmática, torna-o um teste complementar importante na avaliação *in vitro* do sêmen, uma vez que o resfriamento pode levar a efeitos deletérios sobre a membrana (MELO et al., 2005). Embora a aplicação deste teste, para a maioria dos animais não esteja padronizado, o teste hiposmótico pode ser considerado, dentre outros, como um indicador de fertilidade, já que a viabilidade da membrana é um requisito básico para que ocorra a capacitação espermática (MELO E HENRY,

1999). Desta forma, este teste baseia-se em submeter a célula espermática ao estresse, ao ser colocada em uma solução com osmolaridade menor do que a encontrada em seu interior (BITTENCOURT et al., 2005). Ao ser submetido à condição hiposmótica, ocorrerá um influxo de água pela membrana para dentro da célula e conseqüentemente edema celular, na tentativa de realizar um balanço osmótico entre o meio intracelular e extracelular (OBERST et al., 2003). Devido ao aumento de volume da célula ocorrerá dilatação da membrana espermática, levando ao dobramento ou enrolamento do flagelo no interior da membrana (MELO et al., 2005). A reação de enrolamento e/ou dobramento da cauda é considerada como uma reação positiva ao teste, sendo característica de integridade funcional da membrana, que é de fundamental importância para o funcionamento da célula espermática, sendo um dos requisitos mínimos para o processo de fertilização (OBERST et al., 2003).

O teste hiposmótico está altamente correlacionado com o percentual de penetração em ovócitos e fertilização *in vitro* (PEREZ.LLANO et al., 1999). Em ensaios preliminares PEREZ LLANO et al. (1999), encontraram correlação entre o teste hiposmótico e a fertilidade *in vivo* ( taxa de parição) em suínos.

Ducci et al. (2002), avaliaram a integridade da membrana plasmática de espermatozoides de coelho através do teste supravital e do teste hiposmótico em três momentos (zero, cinco e 30 minutos) pós-colheita. Houve aumento no percentual de caudas enroladas com o passar do tempo (T0 = 67,86 ± 4,28%; T5 = 72,86 ± 3,28%; e T30 = 75,14 ± 6,5%; P < 0,05). Estes autores sugeriram que a redução da fertilidade dos ejaculados com altas porcentagens de motilidade pode ser devido à presença de espermatozoides tipo 2 (cauda enrolada e cabeça corada), ou seja, aqueles que têm a membrana plasmática lesada na região da cabeça, permitindo a entrada do corante, mas íntegra na região da cauda, que respondem ao choque hiposmótico.

Em 2005, Bittencourt et al. reportaram que o teste hiposmótico mostrou-se um método eficiente para avaliação da membrana espermática. Porém, é necessário o desenvolvimento de novos estudos para a padronização da técnica, com a confirmação dos melhores solutos e da melhor osmolaridade a serem empregados no teste (SALVINO et al., 2011).

Sendo assim, o teste hiposmótico é uma importante ferramenta complementar para predizer a capacidade de fertilização do sêmen (BACINOGLU et al., 2008).

Contudo ainda não existe padronização do protocolo para a realização da técnica em relação ao tempo de incubação e à osmolaridade da solução para a avaliação seminal (MARTINS et al., 2011).

#### *Teste Supravital (eosina-nigrosina)*

Durante décadas, a integridade da membrana plasmática celular tem sido avaliada por meio da utilização de corantes. Colorações tais como a eosina/nigrosina ou o trypan-blue, também chamadas de colorações “vitais”, comumente são usadas para verificar a integridade física da membrana plasmática do espermatozoide (BRITO et al., 2003).

A integridade da membrana plasmática é um requisito essencial para o metabolismo e função espermática e ainda pode ser avaliada com a coloração eosina-nigrosina ou com uso de sondas fluorescentes (BERNARDI, 2008), sendo que a eosina é um corante supra vital que, ao penetrar na membrana plasmática lesada, liga-se aos ácidos nucléicos, e confere uma coloração rosa ao espermatozoide lesado (BRITO, 2007). Já a nigrosina é responsável pelo contraste mais escuro de fundo da lâmina, o qual permite a visualização dos espermatozoides não corados. Portanto, este teste tem sido recomendado como uma avaliação adicional àquelas de rotina (BRITO, 2007). Essa coloração foi descrita pela primeira vez por Swanson e Bearden (1951); desde então, vem sendo amplamente usada. Este teste avalia apenas a integridade estrutural da membrana plasmática que é correlacionada com alguns processos fisiológicos durante fertilização (capacitação, reação acrossômica, fusão de espermatozoide e óvulo) (JEYENDRAN e VAN DER VEN, 1984).

Por se tratar de um teste fácil de ser realizado e por ser um método acessível a todos os técnicos que atuam na área de andrologia, vem sendo usado na rotina de laboratórios e no campo para a avaliação da integridade estrutural da membrana espermática (MELO et al., 2005).

O desenvolvimento das técnicas de avaliação seminal vislumbra sua utilização a campo, podendo auxiliar na seleção dos melhores reprodutores. Porém, nenhuma das avaliações descritas tem a capacidade de sozinha prever a fertilidade de um macho suíno, sendo necessária a combinação de vários testes, para que se possa chegar um índice de maior correlação com a fertilidade (MARQUES, 2011).

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1. Local da pesquisa**

O experimento foi realizado na Granja de Melhoramento Genético de Suínos (GMS) do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa-MG (GMS-DZO-UFV) que tem como coordenadas geográficas o paralelo de “20°45’14” latitude S, e o meridiano de “42°52’54” longitude W. O clima é do tipo tropical de altitude, com chuvas durante o verão e temperatura média anual em torno de 19°C, com variações entre 10°C (média das mínimas) e 23°C (média das máximas).

#### **3.2. Animais**

Foram realizadas avaliações das características seminais de quatro varrões de duas linhagens (A e B) comerciais (dois varrões de cada linhagem) com idades variando de 2 a 3 anos. Os Varrões 1 e 2 pertenciam à linhagem A e os varrões 3 e 4 à linhagem B.

Foram utilizadas 322 fêmeas reprodutivas que compuseram o plantel de matrizes da referida granja experimental – DZO-UFV. O manejo reprodutivo empregado foi o de inseminação artificial, entre os meses de outubro de 2012 a Setembro de 2013. Durante o período experimental, as fêmeas que retornaram ao estro após as IAs ou aquelas que foram desmamadas integraram o grupo de animais a serem inseminadas, computando assim no total de repetições no modelo experimental.

Para a realização da inseminação artificial, foi realizada a observação do estro das fêmeas duas vezes ao dia (a primeira às 7:00 hs e a segunda, às 17:00 hs), levando o rufião até as baias onde ficavam alojadas as fêmeas não gestantes. Os sinais de estro observados foram: edema e hiperemia vulvar, reflexo de tolerância ao macho, reflexo de tolerância ao homem, aceitação da monta por outras porcas e inquietude. Após a identificação do primeiro estro, foi utilizado um protocolo de duas inseminações. Para porcas adultas, a primeira IA foi realizada 12 horas após a identificação do estro e a segunda 24 horas após a primeira. Para marrãs, a

primeira IA também foi realizada 12 horas após a identificação do estro, mas a segunda foi realizada 12 horas após a primeira. A IA foi realizada com a presença de um rufião a frente das gaiolas e sempre realizada pelo mesmo técnico.

Foram formados lotes de 14 matrizes em função do número de baias na maternidade. As duas inseminações realizadas por estro foram efetuadas com sêmen de um mesmo varrão e em cada lote de fêmeas foram selecionados aleatoriamente no máximo dois varrões.

As fêmeas foram divididas em 5 classes conforme a ordem de parto onde, a classe 1 foi constituída apenas por marrãs, a classe 2 foi formada por porcas de segundo parto, na classe 3 foram agrupadas as porcas de terceiro ao quinto parto, a classe 4 foi formada por porcas de sexto ao oitavo parto e a classe 5 por porcas de nono e décimo parto.

### *3.2.1. Porcas*

As porcas não gestantes foram criadas em baias coletivas de 16m<sup>2</sup> até que se o cio fosse detectado e, após, foram transferidas para as gaiolas para que a IA fosse realizada com segurança. Foram fornecidos 2,5 Kg/dia de ração balanceada para as porcas adultas vazias contendo 12% de Proteína Bruta (PB) e 2,5 Kg/dia de ração com 14% de PB para porcas adultas gestantes. Para marrãs o teor de PB da ração foi o mesmo para porcas adultas o que variou foi a quantidade, que foi de 1,8Kg/dia de ração.

Todos os partos foram acompanhados desde a saída do primeiro leitão até a expulsão completa da placenta.

### *3.2.2 Varrões*

Os varrões foram criados em condições intensivas, em baias individuais de 3 x 4 m (12m<sup>2</sup>) por animal, com fornecimento de 2,5 a 3 kg/dia de ração balanceada para reprodutores com 15 % de PB.

A coleta de sêmen foi realizada pelo método da estimulação com a mão enluvada (HANCOCH e HOVELL, 1959) e auxílio de um manequim móvel. Após a monta, foi efetuado o desvio peniano, realizando-se pressão digital intermitente na glândula até que ocorresse a ereção e ejaculação completa. Os ejaculados foram coletados em copos plásticos descartáveis de 700 mL, devidamente esterilizados, protegidos em embalagens térmicas previamente aquecidas a 38°C e montadas com

dupla camada de gaze, fixadas ao copo com barbante, para reter a fração gelatinosa do sêmen.

### 3.3.3 Coleta de dados

Após a coleta do sêmen foi realizada a pesagem do mesmo, para se obter o volume do ejaculado, necessário para a preparação das doses inseminantes. Posteriormente, com o sêmen já pesado, foi realizada a primeira diluição (1:1) com o diluente Beltsville Thawing Solution - BTS (Bretanha ®). Após a diluição, foi realizada a contagem dos espermatozoides em câmara de Neubauer para definir a concentração do ejaculado (por mL) e o número de espermatozoides por ejaculado para preparação das doses inseminantes. Cada dose inseminante continha 100 mL (sêmen mais diluente) e uma concentração de 3 bilhões de espermatozoides. Em seguida, as doses inseminantes foram mantidas refrigeradas em geladeira com temperatura controlada de 15°C a 18°C por no máximo 72 horas e, avaliado a cada 12 horas. O sêmen *in natura* foi avaliado no ato da coleta e, toda vez que houve a necessidade de inseminar as porcas, o sêmen resfriado foi avaliado pelo mesmo procedimento do sêmen *in natura*.

O sêmen resfriado só foi utilizado nas IAs se apresentasse as condições adequadas para alcançar índices reprodutivos desejáveis preconizadas pelo CBRA (1998) para sêmen resfriado (50% de motilidade espermática e 2,5 de vigor espermático).

No sêmen *in natura* e resfriado, foram realizadas as avaliações física do sêmen e morfológica dos espermatozoides por meio da avaliação da motilidade espermática total, vigor espermático, defeitos maiores, defeitos menores e defeitos totais dos espermatozoides, além dos testes complementares (coloração supra vital e teste hiposmótico) de avaliação espermática.

Para a avaliação física, uma gota de sêmen foi colocada entre lâmina e lamínula, previamente aquecidas a 38°C e em aumento de 100 a 200x foram avaliados a motilidade espermática total (MOT; %) e o vigor espermático (VIG; 0 – 5) (CBRA, 1998). Em um tubo pré-aquecido a 38°C, contendo 1mL de formol-salino tamponado, (HANCOCH, 1957) foram acondicionadas alíquotas do ejaculado suficientes para turvar a solução, para análise morfológica dos espermatozoides realizada por meio de preparação úmida, com auxílio de microscopia de contraste de



fase em aumento de 1000x (sob uma gota de óleo de imersão). Foram contabilizadas 200 células por ejaculado, para determinar o percentual de espermatozoides normais e com anomalias de acrossoma, cabeça, peça intermediária e cauda, tal como preconizado pelo CBRA (1998) e classificados em defeitos espermáticos maiores (DEFM), menores (DEFMEN) e totais (DEFT), conforme os critérios preconizados por Blom (1973).

A coloração supravital foi utilizada para avaliação da integridade física da membrana plasmática, utilizando solução de eosina (1%) e nigrosina (5%), conforme descrito por Swanson e Bearden (1951). Após a confecção de um esfregaço em lâmina pré-aquecida a 38°C, foram contabilizadas 100 células espermáticas (aumento de 400x). As células íntegras permaneceram sem corar e aquelas com danos à membrana coraram-se de rosa avermelhado.

Para o teste hiposmótico, foi utilizada solução de sacarose com osmolaridade de 100 mOsm/kg com 30 minutos de período de incubação a 37°C (GUIMARÃES et al. 2011). Depois do período de incubação, foi acrescentado 0,5 mL de solução formol salina tamponada para a fixação dos espermatozoides e posteriormente foi feita a análise em microscopia de contraste de fase. Foram contabilizados 100 espermatozoides em aumento de 1000X e obtido o percentual de espermatozoides com flagelo curvado junto à membrana expandida. Em seguida foi calculada a porcentagem de espermatozoides reativos, subtraindo do percentual de flagelos dobrados registrados no sêmen in natura ou resfriado pelo percentual obtido no teste hiposmótico (MELO e HENRY, 1999).

### **3.3.3 Leitões**

Após o parto foram contabilizados e registrados em uma planilha o número total de leitões nascidos, o número de leitões nascidos vivos, o número de leitões natimortos e o número de leitões mumificados.

### **3.4. Análises Estatísticas**

Para análise estatística foi empregado o programa estatístico SAEG 9.1 (SAEG, 2007). Estatística descritiva (média, desvio-padrão) foi utilizada para todas as variáveis estudadas (motilidade e vigor espermáticos, defeitos espermáticos e integridade de acrossoma e membrana plasmática). Os dados referentes às avaliações físicas e morfológicas do sêmen foram submetidos aos testes de Lilliefors

e Cochran-Bartlett para verificar a normalidade dos dados e a homogeneidade das variâncias e posteriormente submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey/Duncan ( $\alpha=0,05$ ), para verificar o efeito das duas linhagens comerciais. Os dados referentes a fertilidade dos sêmens empregados foram avaliados por meio da taxa de parição por meio do arranjo dos dados em tabela de contengência e comparados pelo teste de qui-quadrado. A prolificidade ou número de leitões nascidos foi avaliada por meio da análise de variância, verificando o efeito dos varrões das duas linhagens comerciais empregadas.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados registrados para as características físicas do sêmen, morfológica dos espermatozoides e testes complementares realizados nos quatro varrões utilizados neste estudo estão sumariados na Tabela 1.

Tabela 1: Média e desvio-padrão das características reprodutivas de varrões de duas linhagens comerciais.

Características	Varrão				Total
	1	2	3	4	
Motilidade (%)	69,0±8,0(82) <sup>c</sup>	72,6±7,8(80) <sup>b</sup>	74,0±8,1(56) <sup>ab</sup>	76,2±6,8(104) <sup>a</sup>	73,1±8,1(322)
Vigor (1-5)	2,8±0,4 <sup>c</sup>	3,0±0,4 <sup>b</sup>	3,2±0,4 <sup>ab</sup>	3,3±0,4 <sup>a</sup>	3,1±0,5
[ ]/mL <sup>ˆ</sup>	476,9±176,3 <sup>a</sup>	625,0±399,0 <sup>a</sup>	354,6±137,4 <sup>b</sup>	412,2±249,8 <sup>b</sup>	471,5±282,3
[ ]/ejaculado <sup>ˆ</sup>	61,6±21,0 <sup>b</sup>	102,6±56,8 <sup>a</sup>	62,8±19,3 <sup>b</sup>	98,2±53,9 <sup>a</sup>	83,8±47,6
DEFM <sup>ˆ</sup>	5,7±3,5 <sup>a</sup>	4,0±3,4 <sup>b</sup>	2,4±1,8 <sup>c</sup>	4,1±2,9 <sup>b</sup>	4,2±3,2
DEFMEN <sup>ˆ</sup>	3,9±1,9 <sup>a</sup>	3,1±1,6 <sup>a</sup>	2,0±1,2 <sup>b</sup>	3,1±2,0 <sup>a</sup>	3,1±1,9
DEFT <sup>ˆ</sup>	9,6±4,5 <sup>a</sup>	7,1±4,4 <sup>b</sup>	4,4±2,3 <sup>c</sup>	7,2±4,2 <sup>b</sup>	7,3±4,4
Supravital (%) <sup>ˆ</sup>	78,5±9,2 <sup>b</sup>	80,7±8,6 <sup>ab</sup>	82,8±9,4 <sup>a</sup>	82,3±12,2 <sup>a</sup>	81,0±10,3
Hiposmótico(%) <sup>ˆ</sup>	62,5±12,4 <sup>b</sup>	59,6±11,5 <sup>b</sup>	71,1±16,2 <sup>a</sup>	70,6±15,1 <sup>a</sup>	66,4±14,5
Total de fetos	11,7±2,8(82) <sup>c</sup>	13,1±2,9(80) <sup>b</sup>	13,8±2,6(56) <sup>ab</sup>	15,8±3,2(104) <sup>a</sup>	13,7±3,3(322)

<sup>a,b</sup>Médias de valores na mesma linha, seguidas de letras minúsculas diferentes pelo teste de Tukey ( $p<0,05$ ); <sup>\* a,b</sup>Médias de valores na mesma linha, seguidas de letras minúsculas diferem entre si pelo teste de Teste de Kruskal – Wallis ( $p<0,05$ ); Média±dp( ) = Média, desvio padrão e número de observações; [ ]/mL: concentração espermática/mL x 10<sup>6</sup>; [ ]/ejaculado: concentração espermática/ejaculado x 10<sup>9</sup>; DEFM: % de defeitos maiores; DEFMEN: % de defeitos menores; DEFT: % de defeitos totais.

No geral, resultados superiores foram registrados para os machos da linhagem B (varrões 3 e 4). O varrão 4 apresentou valores superiores de viabilidade espermática e também no número total de fetos ( $p<0,05$ ) em relação aos varrões 1 e

2 (Tabela 1). É esperado um maior número de fetos nascidos quando existe boa viabilidade espermática, pois as células que permanecem íntegras apresentam maior capacidade de fertilizar o ovócito. Desta forma, pode-se observar que o macho 1 da linhagem comercial A apresentou resultados inferiores referentes à motilidade ( $p < 0,05$ ), além de diferir dos reprodutores da linhagem B no teste supravital ( $p < 0,05$ ), estando correlacionado com os resultados inferiores encontrados para o número total de fetos nascidos ( $p < 0,05$ ) quando comparado com os demais reprodutores. Porém, o macho 2 de mesma linhagem, diferiu apenas no teste hiposmótico dos machos 3 e 4, integrante da linhagem comercial B. Portanto, os resultados apresentados na tabela 1 demonstraram a possibilidade de selecionar machos a partir dos resultados *in vitro* de testes que avaliam a viabilidade dos espermatozoides.

Segundo Acosta et al. (2007), um dos principais problemas atuais na reprodução de suínos tem sido diferenciar ejaculados férteis e inférteis para classificar os reprodutores segundo o grau de qualidade seminal.

Sabe-se que o tamanho da leitegada pode variar entre cachaços quando o mesmo número de espermatozoides é empregado por dose (FLOWERS, 2002). De acordo com Foxcroft et al. (2008), esta informação permite comparar o potencial reprodutivo de cachaços submetidos a uma avaliação *in vivo*. Nesta metodologia comparam-se os resultados referentes à taxa de parto e ao número de leitões nascidos totais entre diferentes cachaços submetidos ao mesmo protocolo de inseminação artificial e os critérios de avaliação laboratorial do ejaculado. Dados de Foxcroft et al. (2010) demonstraram que a média de nascidos totais de 31 reprodutores foi de 12,26 leitões, entretanto quando foram removidos todos os reprodutores com resultados abaixo da média da população (9 reprodutores) da análise, a média de nascidos totais foi para 13,29 leitões.

Quando há maior variação nas características seminais, a associação com os dados de fertilidade parece ser mais facilmente detectada (BERNARDI, 2008). No entanto, apesar da diferença registrada ( $p < 0,05$ , Tabela 1) em relação às anormalidades espermáticas entre os reprodutores do presente estudo, estas estão dentro dos limites aceitáveis, conforme preconizado pelo CBRA (1997).

Gadea et al. (1998) separaram os ejaculados de quatro machos de acordo com a taxa de parição, nos seguintes grupos: baixa (0-20%), intermediária (40-60%) e alta (80-100%) fertilidade. Os ejaculados referentes ao grupo de baixa fertilidade

apresentavam, em média, 43% de espermatozoides com defeitos, em contraste com 11% no grupo de alta fertilidade. A motilidade do sêmen fresco foi menor no grupo baixa fertilidade ( $63,7\% \pm 3,1$ ) em comparação aos grupos intermediária ( $74,5\% \pm 1,7$ ) e alta ( $76,6\% \pm 1,0$ ) fertilidade. A porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática bioquimicamente ativa, avaliados pelo teste hiposmótico, também foi menor no grupo baixa fertilidade ( $34,8\% \pm 3,1$ ) quando comparados com os grupos intermediários ( $49,7\% \pm 2,6$ ) e altos ( $51,6\% \pm 1,6$ ).

Quanto ao índice de fertilidade (baixa, intermediária e alta), os resultados apresentados por Gadea et al. (1998), foram semelhantes aos do presente estudo, onde o macho 1, que obteve o menor valor para o número total de fetos nascidos (11,7), apresentou juntamente com o macho 2, as menores porcentagens de espermatozoides com membrana plasmática bioquimicamente ativa (62,5% e 59,6% respectivamente), além de ser o reprodutor que apresentou a média mais baixa referente a motilidade espermática (69,0%). Em relação à morfologia espermática, apesar do referido macho ter uma maior porcentagem de espermatozoides com defeitos, os números apresentados para tal característica estão dentro dos parâmetros preconizados pelo CBRA e, portanto, podem não ter interferido na baixa fertilidade.

Já o macho 4, que juntamente com o macho 3 apresentaram as melhores médias para o número total de fetos nascidos (15,8 e 13,8 respectivamente), também integraram o grupo de reprodutores que obtiveram resultados superiores de motilidade espermática (76,2% e 74,0% respectivamente) e membrana plasmática bioquimicamente ativa avaliada pelo teste hiposmótico (70,6% e 71,1%). De acordo com Foxcroft et al. (2010), uma vez comprovada a fertilidade e conhecido o valor genético de um reprodutor, a disseminação de genes de grande interesse econômico no plantel, através do uso intensificado e direcionado desse, é o ponto chave para eficiência do sistema de produção.

As médias e desvios-padrão das características reprodutivas dos quatro varrões utilizados neste estudo, agrupadas de acordo com o tempo de resfriamento do sêmen, avaliado de 12 em 12 horas (0-72 horas) estão sumariados na Tabela 2.

Tabela 2: Média e desvio-padrão das características reprodutivas de quatro varrões avaliados pós-diluição do sêmen no momento das inseminações artificiais.

Características	Tempo de resfriamento (h)						
	0	12	24	36	48	60	72
Motilidade (%)	84,0±5,1 <sup>a</sup>	78,6±3,4 <sup>b</sup>	77,0±5,4 <sup>bc</sup>	73,3±3,6 <sup>cd</sup>	68,9±3,3 <sup>de</sup>	66,4±2,4 <sup>e</sup>	69,4±6,2 <sup>de</sup>
Vigor (1-5)*	3,7±0,4 <sup>a</sup>	3,3±0,4 <sup>b</sup>	3,1±0,3 <sup>b</sup>	2,9±0,2 <sup>b</sup>	3,1±0,2 <sup>b</sup>	2,7±0,3 <sup>b</sup>	2,7±0,3 <sup>bd</sup>
DEFM*	4,0±1,8 <sup>a</sup>	3,3±2,8 <sup>a</sup>	3,8±2,3 <sup>a</sup>	3,9±2,8 <sup>a</sup>	4,9±4,5 <sup>a</sup>	5,0±3,8 <sup>a</sup>	3,5±2,8 <sup>a</sup>
DEFMEN	2,2±1,5 <sup>a</sup>	3,3±1,7 <sup>a</sup>	2,6±1,5 <sup>a</sup>	3,1±2,2 <sup>a</sup>	2,9±2,0 <sup>a</sup>	3,3±2,6 <sup>a</sup>	2,9±1,2 <sup>a</sup>
DEFT*	6,2±3,1 <sup>a</sup>	6,6±3,2 <sup>a</sup>	6,4±2,3 <sup>a</sup>	7,0±4,3 <sup>a</sup>	7,8±6,0 <sup>a</sup>	8,3±6,3 <sup>a</sup>	6,4±3,4 <sup>a</sup>
Supravital (%)*	92,5±4,4 <sup>a</sup>	85,9±13,7 <sup>bc</sup>	82,6±6,2 <sup>b</sup>	80,0±6,6 <sup>b</sup>	74,4±5,1 <sup>bd</sup>	80,0±4,3 <sup>b</sup>	76,4±2,9 <sup>bd</sup>
Hiposmótico(%)*	87,2±7,0 <sup>a</sup>	76,9±7,2 <sup>bc</sup>	66,8±9,4 <sup>b</sup>	62,9±2,8 <sup>bc</sup>	58,1±6,4 <sup>bc</sup>	53,1±2,4 <sup>c</sup>	47,7±4,2 <sup>d</sup>
Total de fetos**	14,9±3,8 <sup>a</sup>	13,0±3,3 <sup>b</sup>	14,6±3,1 <sup>ab</sup>	12,5±2,9 <sup>b</sup>	13,6±1,9 <sup>ab</sup>	12,6±2,9 <sup>b</sup>	14,2±2,1 <sup>ab</sup>

<sup>a,b</sup>Médias de valores na mesma linha, seguidas de letras minúsculas diferentes pelo teste de Tukey e\*\* teste de Duncan (p<0,05); \* <sup>ab</sup>Médias de valores na mesma linha, seguidas de letras minúsculas diferem entre si pelo teste de Kruskal Wallis (p<0,05); Média±dp( ) = Média, desvio padrão e número de observações; DEFM: % de defeitos maiores; DEFMEN: % de defeitos menores; DEFT: % de defeitos totais.

Observa-se que, de um modo geral, os valores registrados nos testes que avaliam a viabilidade dos espermatozoides (principalmente motilidade e hiposmótico) diminuíram com o tempo de armazenamento (p<0,05). O mesmo não aconteceu com o número total de fetos nascidos, que não deferiu quando as fêmeas foram inseminadas com doses correspondentes a hora zero (0), ou 72 horas após a coleta do sêmen. Com isso, é possível afirmar que a utilização de doses armazenadas por 72 horas, desde que se encontre com valores mínimos aceitáveis de motilidade espermática (50%), não interfere na taxa de parição quando estas são processadas a partir de coletas de sêmen de machos comprovadamente férteis.

Como as IAs foram realizadas conforme a entrada das matrizes na fase estral, não foi possível obter uma distribuição uniforme das doses referentes aos reprodutores de acordo com o tempo de resfriamento. Desta forma, os menores valores observados para o número total de fetos das doses armazenadas por 12(13,0), 36(12,5) e 60(12,6) horas podem ser atribuídos ao maior número de fêmeas inseminadas com os machos 1 e 2 da linhagem A que, mesmo apresentando valores aceitáveis em relação às avaliações seminais como mostrado na tabela 1, apresentaram-se menos férteis.

Pérez-Llano (2001), avaliando o sêmen estocado por 9 dias a 15°C não encontrou diferença (p>0,01) quanto à motilidade até as 48 horas de armazenamento. Contudo, no presente estudo, foi observado que logo após a diluição e preparação das doses de sêmen (tempo 0), o valor para motilidade diferiu

( $p < 0,05$ ) entre os demais tempos de armazenamento (tabela 2). O referido autor também avaliou a porcentagem de espermatozoides viáveis pelo teste hiposmótico e encontrou diferença ( $p < 0,01$ ) do momento da estocagem ( $81,5 \pm 1,2\%$ ) até o período de 24 horas de armazenamento ( $50,8 \pm 2,2\%$ ) onde foi realizada a primeira avaliação após o período de resfriamento. No entanto, no presente estudo, já nas primeiras 12 horas de estocagem do sêmen, foi observada diferença ( $p < 0,05$ ) do número de espermatozoides viáveis pelo teste hiposmótico quando comparada com a porcentagem de espermatozoides viáveis logo após a diluição.

Em estudo realizado por Hofmo (1991), na Noruega, onde foram analisados dados de fertilidade de sêmen suíno diluído em BTS e armazenados por um período máximo de 72h, houve um decréscimo de 5% na taxa de parto e 0,35 de leitões nascidos vivos, quando o sêmen foi utilizado após 48h de armazenamento.

A motilidade do sêmen diluído em BTS, no presente estudo, esteve abaixo dos valores relatados por outros autores. Com armazenamento de 120h, vários autores (SCHEID et al., 1993; WABERSKI et al., 1994; REIS et al., 2000) observaram percentuais de motilidade iguais ou acima de 60%. No presente estudo, a motilidade do sêmen foi de 84,0% após a diluição em BTS e diminuiu para 69,4% já nas 72 horas de armazenamento (Tabela 2).

Em relação aos testes complementares, houve um maior decréscimo na porcentagem de espermatozoides viáveis pelo teste hiposmótico quando comparado com o teste supravital (tabela 2). Portanto, essa diferença provavelmente não interferiu na taxa de parição. A integridade da membrana plasmática vem sendo estudada por diferentes técnicas, e a combinação delas tem ajudado a explicar as variações observadas. Tartaglione e Ritta (2004) avaliando sêmen de touros, explicaram a variação na taxa de fecundação quando combinaram os resultados do teste hiposmótico com o teste supravital, tendo sido encontrados 69,8% de espermatozoides com membrana íntegra na avaliação com o corante supravital e 58,8% de células reativas ao teste hiposmótico. Combinando-se os dois testes, foi possível reduzir o número de falsos positivos e aumentar a habilidade para detectar diferenças nas propriedades da membrana plasmática, obtendo-se 51,2% de espermatozoides vivos e reativos (funcionais).

No presente estudo, os valores encontrados para os testes complementares que avaliam a viabilidade da membrana plasmática dos espermatozoides logo após a diluição (tempo 0h) foram superiores aos encontrados nas doses que foram

resfriadas ( $p < 0,05$ ). A integridade física da membrana plasmática avaliada pelo teste supravital caiu de 92,5% para 85,9%, e a atividade bioquímica da membrana plasmática avaliada pelo teste hiposmótico caiu de 87,2% para 76,9% após 12 horas de estocagem e, após 72 horas de resfriamento estes valores diminuíram para 76,4% e 47,7% nos testes supravital e hiposmótico respectivamente (Tabela 2).

No que diz respeito ao vigor espermático, segundo CBRA (1998), somente o sêmen apresentando um vigor mínimo de 2,5 é capaz de manter sua capacidade fecundante. Nesse sentido, observa-se que em todos os tratamentos, esse valor foi mantido por até 72 horas de estocagem (Tabela 2).

Alkimin (2010), avaliando o efeito de dois diluentes (MR-A e glicina-gema de ovo) encontrou que os valores máximos referentes aos defeitos totais de espermatozoides nos diferentes tratamentos e tempos de estocagem do sêmen, estiveram próximos do limiar de 20% recomendado como padrão a ser seguido para a utilização de uma dose inseminante (CBRA, 1998). Adicionalmente, este autor, não observou diferenças ( $p > 0,05$ ) para esta variável entre os diferentes tratamentos no sêmen a fresco. Em todos os tratamentos, houve um incremento progressivo ( $p < 0,05$ ) dos percentuais de defeitos totais em decorrência do tempo de armazenamento. Comparando os valores do sêmen a fresco e após 72 horas de estocagem, houve um aumento ( $p < 0,05$ ) do total de patologias para todos os tratamentos. Resultado este, diferente do encontrado no presente estudo, onde não foi observada diferença ( $p > 0,05$ ) na porcentagem de defeitos totais entre o sêmen recém diluído e o que foi armazenado por 72 horas (Tabela 2). Adicionalmente, durante todo o tempo de resfriamento das doses inseminantes, as porcentagens de patologias totais encontradas no presente estudo não ultrapassaram 10%, permanecendo dentro dos padrões preconizados pelo CBRA (1998).

Na Figura 1, são apresentados quatro gráficos que ilustram as características reprodutivas dos quatro varrões avaliados individualmente, de acordo com a hora que o sêmen resfriado foi utilizado para inseminar as fêmeas.

Apesar dos testes que avaliam a viabilidade dos espermatozoides apresentarem uma queda nas porcentagens conforme o tempo de armazenamento (gráficos a, b, c), o mesmo não foi observado em relação ao número total de fetos nascidos (gráfico d) onde os resultados mantiveram-se aproximados. Foi observada uma maior diferença em relação à fertilidade entre os machos 1 e 4. O reprodutor 4

mostrou-se superior ao reprodutor 1 durante todas as avaliações referentes ao número total de fetos nascidos.

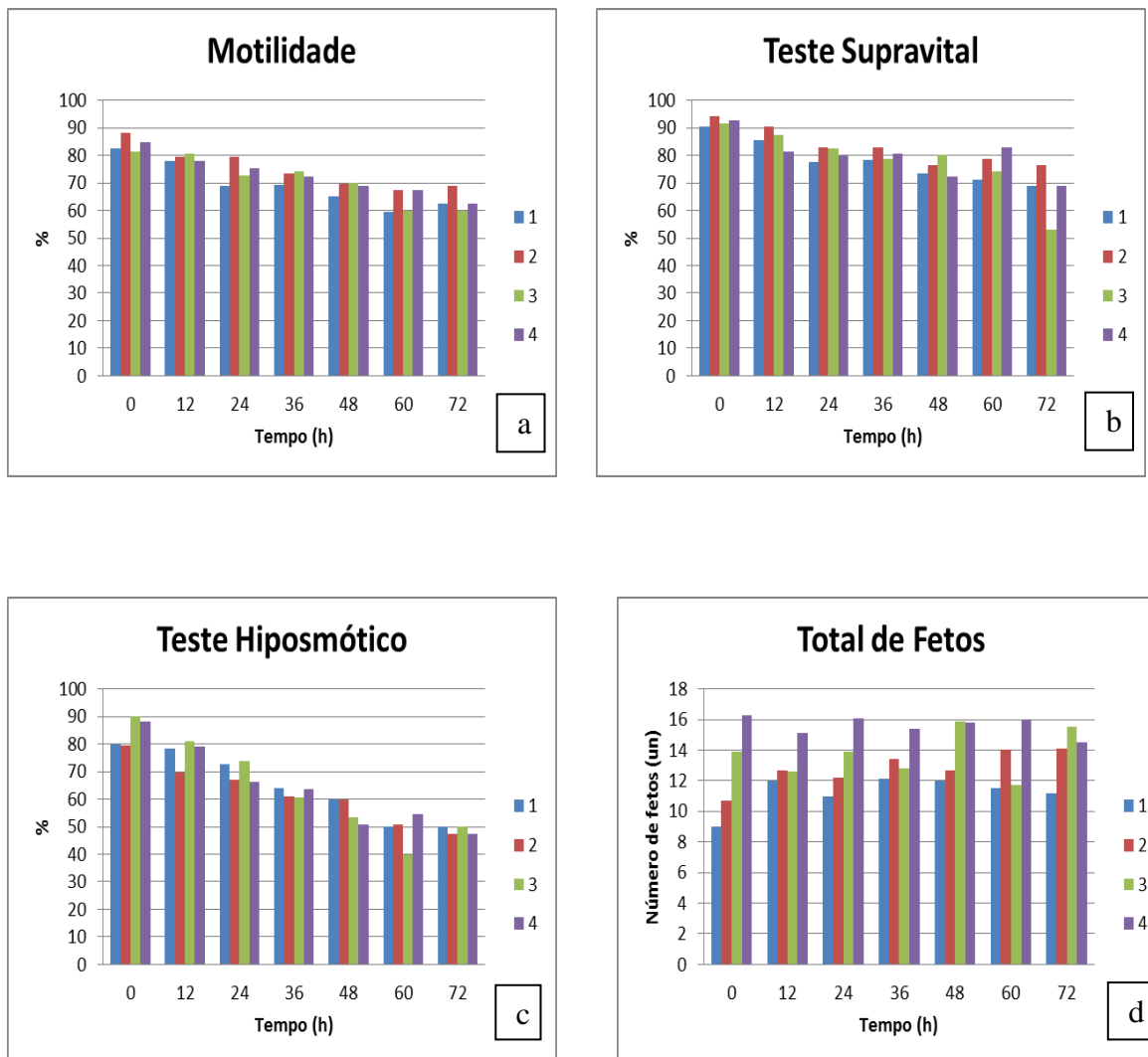


Figura 1: características reprodutivas dos quatro varrões avaliados individualmente, de acordo com a hora que o sêmen resfriado foi utilizado para inseminar as fêmeas.

Como observado na figura 1, os valores obtidos nos testes que avaliam a viabilidade da membrana plasmática dos espermatozoides não diferenciaram nem entre os machos tampouco entre as linhagens ( $p > 0,05$ ) logo após a diluição (tempo 0). No entanto, os varrões 1 e 2 da linhagem A, foram responsáveis pelo pior desempenho no que diz respeito ao número total de fetos nascidos ( $9,0 \pm 2,8$  e  $10,7 \pm 5,5$  respectivamente) quando a dose inseminante utilizada era referente à zero hora de armazenamento, ou seja, quando o ejaculado era diluído e utilizado sem ser resfriado a  $15^{\circ}\text{C}$ . O macho 4 da linhagem B, foi o reprodutor que apresentou o



melhor valor para o número total de fetos nascidos ( $16,3 \pm 3,5$ ) para o referido momento de inseminação. Contudo, esse valor não diferiu daquele obtido pelo macho 3 ( $13,9 \pm 1,6$ ), de mesma linhagem, pelo teste de Duncan ( $p > 0,05$ ).

Após 24 horas de resfriamento, dos testes que avaliam a viabilidade espermática (motilidade, supravital e hiposmótico), apenas a motilidade apresentou valores que se diferenciaram entre os machos. Ambrogi et al. (2006) observaram que a porcentagem de motilidade das células espermáticas reduziu com o tempo de armazenamento do sêmen, demonstrando que o seu armazenamento a  $17^{\circ}\text{C}$ , por 96 horas, pode afetar a sua capacidade fecundante. O reprodutor 1 da linhagem A, foi o que apresentou o pior valor para a motilidade espermática ( $68,9 \pm 4,9\%$ ) e isso pode ter influenciado no número total de fetos nascidos, onde este reprodutor também obteve o pior resultado ( $11,0 \pm 2,8$ ). O valor apresentado pelo reprodutor 3 referente à motilidade não diferiu ( $p > 0,05$ ) de nenhum dos valores obtidos pelos outros machos, no entanto, este reprodutor obteve resultado distinto em relação ao número total de fetos nascidos ( $13,9 \pm 2,5$ ), quando comparado com os reprodutores 1 e 4 ( $11,0 \pm 2,8$  e  $16,1 \pm 3,1$  respectivamente). O reprodutor 4, outra vez, foi o que obteve o melhor valor para o número total de fetos nascidos. Os valores encontrados no número total de fetos nascidos para os reprodutores 2 e 3 não diferenciaram estatisticamente ( $12,2 \pm 3,2$  e  $13,9 \pm 2,5$ ; respectivamente). De acordo com Alkmin (2010), espera-se que menores resultados encontrados para motilidade interfiram nos valores obtidos para o número total de fetos nascidos e, foi o que aconteceu quando a dose inseminante foi utilizada após o armazenamento por 24 horas.

Costi (2003) encontrou percentuais de motilidade superiores, entre zero ( $85,6 \pm 10,7\%$ ) e 24 horas ( $76,5 \pm 16,5\%$ ) de estocagem com o diluente BTS quando comparados com doses estocadas por 48 ( $67,92 \pm 24,71\%$ ) a 72 horas ( $61,7 \pm 30,8\%$ ), valores estes, semelhantes às médias observadas no presente estudo. A metodologia utilizada para avaliação da motilidade espermática por Costi (2003) foi semelhante à utilizada no presente experimento, sendo realizada de maneira subjetiva em ambos os trabalhos. Embora seja difícil comparar os dados de ambos experimentos, pode-se atribuir as diferenças na motilidade espermática observada entre os trabalhos à forma de julgamento e classificação subjetiva, já que considera-se que essa avaliação pode apresentar diferenças entre avaliadores. Contudo, não se pode descartar outros fatores relacionados ao processamento do sêmen capazes de influenciar o percentual de motilidade espermática em uma amostra.

De acordo com a Figura 1, no presente estudo, nas doses de sêmen utilizadas após 48h de resfriamento, o macho 4 obteve  $72,2 \pm 2,7\%$  de espermatozoides viáveis pelo teste supravital e  $50,7 \pm 8,6\%$  de espermatozoides viáveis pelo teste hiposmótico, valores estes, que se mostraram inferiores quando comparados com os valores dos demais machos. Isto pode ser devido a uma possível contaminação oriunda da coleta do ejaculado, ou mesmo durante o processamento da dose inseminante. Porém, esses menores valores não interferiram no número total de fetos nascidos onde os machos 3 e 4, da linhagem B, obtiveram maiores números ( $15,9 \pm 2,3$  e  $14,2 \pm 2,9$ ; respectivamente) quando comparados com os machos 1 e 2 da outra linhagem ( $12,0 \pm 1,4$  e  $12,7 \pm 2,4$ ; respectivamente).

Reis (2002) avaliou se a motilidade espermática durante o armazenamento ( $17^\circ\text{C}$ ) apresentava o mesmo padrão de comportamento que a morfologia de acrossoma e integridade das membranas, com o objetivo de correlacionar com a fertilidade. Para tal, cinco ejaculados de 31 machos foram analisados e classificados em 3 grupos (longa, média e curta) conforme duração da viabilidade *in vitro*. Concluiu então, que apenas a motilidade e a integridade de membrana permitem a diferenciação entre os machos de maior e menor duração da viabilidade a  $17^\circ\text{C}$ . Observou ainda que a duração da viabilidade espermática se repete nas coletas subsequentes, uma vez que os machos de longa duração, não apresentaram ejaculados de curta duração e os machos classificados como de curta nunca foram classificados como de longa. Entretanto, as amostras de média duração apresentaram tanto ejaculados de longa como de curta duração.

Apesar de apresentar resultados iguais ou superiores a todos os machos no que se refere às avaliações físicas e morfológicas do sêmen, o macho 1 obteve um número total de fetos menor ( $11,2 \pm 1,3$ ) do que os demais machos quando o sêmen resfriado por 72h foi utilizado para a inseminação. Esta diferença pode estar ligada ao fato dos espermatozoides provindos do reprodutor 1 possuir uma menor viabilidade após serem depositados no trato reprodutivo das fêmeas. Segundo Bortolozzo et al. (2005b), os espermatozoides depositados no útero permanecem viáveis para fecundar os ovócitos por 16-24 horas. O envelhecimento dos espermatozoides ocorre durante a estocagem *in vitro*, e após a inseminação, quando a população viável de espermatozoides “aguarda” a ovulação para ser liberado do reservatório espermático. Desta forma, o sucesso da fertilização é

influenciado por dois períodos de envelhecimento espermático, o da estocagem *in vitro*, que pode durar até cinco dias, e o envelhecimento *in vivo*, o qual aumenta quando o intervalo entre a IA e a ovulação é superior a 12 até 24 horas (WABERSKI et al., 1994).

Entretanto, o menor valor encontrado no teste supravital pelo macho 3 (53,0%) não teve reflexo no número de fetos nascidos (15,5). Desta forma, pode-se dizer que o teste supravital realizado após 72 horas de armazenamento da dose inseminante não influenciou no número total de fetos nascidos quando os valores para este teste variaram entre 53,0 e 76,6%.

A suinocultura moderna busca aumentar constantemente a produtividade, sendo que o número de leitões nascidos vivos e totais são dois importantes parâmetros para a avaliação da eficiência reprodutiva em matrizes suínas. Os aspectos ligados à reprodução como fertilidade e a prolificidade são elementos importantes, pois interferem diretamente na exploração suinícola, sendo primordiais dentro do processo produtivo (RIBEIRO, et al., 2008).

De acordo com os resultados apresentados pela tabela 3, fêmeas de ordem de parto de 2 a 5 são as que obtiveram um maior número de leitões nascidos vivos. Já as porcas de ordem de parto 1 e 2 foram as que apresentaram um menor número de leitões nascidos mortos, assim como as fêmeas da classe 3, que não se diferenciaram estatisticamente daquelas, para a referida característica. O número total de fetos nascidos, assim como o número de fetos nascidos mumificados não diferenciaram ( $p>0,05$ ) segundo a ordem de parto.

Tabela 3: Média e desvio padrão das características do nascimento dos leitões de acordo com a classe de ordem de parto das fêmeas inseminadas.

<b>Características</b>	<b>Classe</b>					<b>Total</b>
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	
NLNV	10,6±2,6 <sup>a</sup>	12,4±3,1 <sup>b</sup>	12,7±2,6 <sup>b</sup>	10,8±2,9 <sup>a</sup>	10,5±2,9 <sup>a</sup>	11,5±3,1

NLNM	0,9±1,3 <sup>a</sup>	0,8±1,1 <sup>a</sup>	1,3±1,4 <sup>ac</sup>	2,2±2,7 <sup>bc</sup>	3,3±3,2 <sup>b</sup>	1,7±2,3
Mumificados	0,4±0,6 <sup>a</sup>	0,4±0,7 <sup>a</sup>	0,6±0,7 <sup>a</sup>	0,7±1,1 <sup>a</sup>	0,6±1,0 <sup>a</sup>	0,5±0,9
Total de fetos	12,0±2,5 <sup>a</sup>	14,5±2,6 <sup>a</sup>	14,5±2,6 <sup>a</sup>	13,7±3,9 <sup>a</sup>	14,4±3,4 <sup>a</sup>	13,7±3,3

<sup>a,b</sup>Médias de valores na mesma linha, seguidas de letras minúsculas diferem entre si pelo teste de Kruskal Wallis ( $p < 0,05$ ); Média±dp( ) = Média, desvio padrão e número de observações; NLNV: Número de leitões nascidos vivos; NLNM: Número de leitões natimortos; Classe 1: marrã; Classe 2: segundo parto; Classe 3: terceiro ao quinto partos; Classe 4: sexto ao oitavo partos; Classe 5: nono ao décimo primeiro partos.

Apesar de o número total de leitões nascidos não ter diferido em relação às ordens de parto, o número de leitões nascidos vivos diferiu. Isto pode ser devido ao fato de marrãs possuírem uma menor habilidade materna. No entanto, já no segundo parto, onde de acordo com Schenkel et al., (2005) ocorre a “síndrome do segundo parto” houve um aumento no número de leitões nascidos vivos. Estes resultados contrastam com os encontrados por Schenkel et al. (2007) que encontraram um maior número de leitões nascidos vivos no primeiro parto em relação ao segundo.

Alkmin (2010) avaliou o efeito de protocolos de resfriamento do sêmen sobre a fertilidade de porcas de terceiro ou quarto parto, inseminadas com doses armazenadas durante um período de 12 a 72 horas e encontrou uma média de 15,0 de leitões nascidos totais; 14,3 de leitões nascidos vivos; 0,7 de leitões natimortos e 0,7 de leitões mumificados. De acordo com o presente estudo, as porcas da classe 3, onde estavam inseridas as fêmeas de terceiro, quarto e quinto parto, apresentaram valores semelhantes aos encontrados por Alkmin (2010) no que diz respeito ao número total de fetos nascidos (14,5) e ao número de fetos mumificados (0,6). Porém os valores referentes ao número de leitões nascidos vivos (12,7) e número de leitões natimortos (1,3), apresentaram-se inferiores aos registrados por Alkmin (2010)

Ribeiro et al. (2008) estudando o efeito da taxa de parto sobre a fertilidade em suínos, não encontrou diferença ( $p > 0,05$ ) no número de leitões nascidos vivos nas porcas de 1º, 2º, 3º, 4º e 6º partos e nem entre porcas de 1º, 2º, 3º, 4º e 7º partos. Também não encontrou diferença entre as porcas de 3º, 4º, 5º e 6º partos. Entretanto, observou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para o número de leitões nascidos vivos entre porcas de 5º em comparação com as de 1º, 2º e 7º partos. Para o número de leitões nascidos totais, as médias encontradas mostraram que não encontrou diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) nas porcas de 1º parto quando

comparadas com as de 2º, 3º e 7º partos. O mesmo aconteceu entre as porcas de 3º parto em relação às porcas de 4º, 5º e 7º partos e entre as porcas de 4º comparadas com as de 5º, 6º e 7º partos. Contudo, encontrou uma diferença significativa ( $P < 0,05$ ) para o número de leitões nascidos totais entre as porcas de 1º e 2º partos em relação às de 4º, 5º e 6º partos. No entanto, Moretti et al. (2005) encontraram um maior número de leitões nascidos vivos no 7º parto. No presente estudo, foi encontrado um maior número de leitões nascidos vivos em porcas de segundo ao quinto parto (classe 1 e 2), a partir do sexto parto (classe 3) houve um decréscimo no número de leitões nascidos vivos, podendo ser devido a possíveis distocias que são comuns em porcas com ordem de parto maiores. Segundo Pejask (1984), fêmeas mais velhas possuem tônus muscular menor e partos mais prolongados.

Privado Filho e Toniollo (2011) encontraram que, em relação ao tamanho da leitegada, a ordem de parto 1 apresentou o número médio de leitões nascidos totais/leitegada superior a ordem de parto 2, assim como o número de leitões nascidos vivos/leitegada também se mostrou superior ao da ordem de parto 2. Fato este diferente do encontrado por Martins et al (2005), que relataram que as primíparas apresentaram menor número de leitões totais nascidos e nascidos vivos em relação as outras ordens de parto. Mas está de acordo com Schenkel et al (2007) que afirmam haver a redução de leitões no segundo parto em relação ao primeiro em diversas granjas. Os números médios de leitões nascidos vivos na ordem de parto 1 foi de 10,6 conforme a tabela 10, e mostraram-se ligeiramente superiores aos 10,18 observados por Crestani (1995). A média de total de leitões nascidos observada na ordem de parto 1 de 12,0 foi superior à de 10,56 encontrada para mesma ordem de parto observada por Bento (2003).

Na ordem de parto 2, a média dos valores apresentados na Tabela 3, foi de 12,4 de leitões nascidos vivos. Os números foram superiores aos encontrados por Privado Filho e Toniollo (2011) que observaram uma variação de 8,8 a 11,3 de leitões nascidos vivos. A média total de leitões nascidos de 14,5 também mostrou-se superior à média encontrada por Privado Filho e Toniollo de 10,0 leitões/leitegada. Essas diferenças podem ser devido ao fato do experimento de Privado Filho e Toniollo (2011) ter sido realizado no sudeste goiano, região conhecidamente quente, o que eleva o nível de estresse das matrizes, desta forma interferindo nas taxas de fertilidade. Segundo Costa et al. (2005) as elevadas temperaturas aumentam a taxa de mortalidade embrionária, principalmente durante o primeiro mês de gestação.

A seguir (tabela 4), são demonstrados os valores de correlação entre todos os parâmetros estudados.

Tabela 4: Correlação de Pearson entre testes de avaliações espermáticas e fertilidade de suínos

	TFETOS	NLNV	NLN	NLM	MOT	VIG	DEM	DEMEN	DEFT	SV	HIPO
TFETOS	1	0,66	0,46	0,23	0,14	0,17	NS	-0,17	NS	NS	0,15
NLNV		1	-0,31	-0,16	0,18	0,21	NS	-0,16	NS	NS	NS
NLN			1	0,15	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
NLM				1	NS	NS	-0,13	NS	-0,14	NS	NS
MOT					1	0,82	NS	-0,18	NS	0,6	0,62
VIG						1	NS	NS	NS	0,6	0,52
DEM							1	0,36	0,9	NS	NS
DEMEN								1	0,74	NS	NS
DEFT									1	NS	NS
SV										1	0,43
HIPO											1

TFETOS: número total de leitões nascidos por leitegada; NLNV: número de leitões nascidos vivos; NLN: número de leitões natimortos; NLM: número de leitões mumificados; MOT: motilidade; VIG: vigor; DEM: defeitos maiores; DEMEN: defeitos menores; DEFT: defeitos totais; SV: teste supravital; HIPO: teste hiposmótico.

Foi observada uma correlação significativa entre o número total de fetos nascidos e o número de leitões nascidos vivos ( $r=0,66$ ). Resultado este já previsto, uma vez que com o aumento do número total de leitões nascidos por leitegada é esperado também um número maior de leitões nascidos vivos. Assim como é esperado também, com o aumento do número de fetos nascidos, um aumento no número de leitões natimortos ( $r=0,46$ ) e no número de mumificados ( $r=0,23$ ).

Espera-se que com doses de sêmen contendo altas taxas de espermatozoides móveis e com alta força de deslocamento haja um maior número de leitões nascidos totais além de um maior índice de leitões nascidos vivos por leitegada, fato observado no presente estudo, onde ocorreu uma correlação significativa entre a motilidade e o número total de fetos nascidos ( $r=0,14$ ), e o número de leitões nascidos vivos ( $r=0,18$ ). Neste sentido, Gadea et al. (1998) observaram uma correlação positiva ( $p<0,01$ ) entre tamanho da leitegada e motilidade do sêmen fresco ( $r=0,34$ ) e entre tamanho da leitegada e teste hiposmótico ( $r=0,35$ ). Gadea et al. (2004) encontrou correlação positiva ( $p<0,05$ ) entre a motilidade e o número total de fetos nascidos ( $r=0,12$ ). Porém não foi

observada uma correlação entre o número de leitões nascidos vivos com a motilidade. Da mesma forma, Pérez-Llano (2001) também encontrou correlação positiva ( $p < 0,01$ ) entre motilidade e número total de fetos nascidos ( $r = 0,05$ ). Houve também uma correlação positiva ( $p < 0,01$ ) entre o número total de fetos nascidos com o teste hiposmótico ( $r = 0,04$ ). Ruiz-Sánchez et al. (2006) verificaram correlação significativa entre a motilidade seminal aos 7 e 10 dias de armazenamento e os resultados de fertilidade de 12 machos avaliados. No estudo de Xu et al. (1998), entretanto, foram observadas diferenças na motilidade espermática de seis machos avaliadas durante armazenamento ao longo de oito dias, porém não foram verificadas diferenças na taxa de parto ou no tamanho da leitegada.

É previsto que haja uma correlação significativa entre os testes que avaliam a viabilidade da membrana plasmática e o número total de fetos nascidos, porém foi observada apenas uma correlação entre o teste hiposmótico e o número total de fetos nascidos ( $r = 0,15$ ). O teste supravital não obteve correlação significativa com o número total de fetos nascidos ( $p > 0,05$ ). Em relação às anormalidades espermáticas apenas os defeitos menores obtiveram correlação significativa com o número total de fetos ( $r = -0,17$ ). Os demais índices que avaliam as anormalidades espermáticas (defeitos maiores e defeitos totais) não obtiveram correlações com o número total de fetos nascidos ( $p > 0,05$ ) (Tabela 4).

Foi observada também uma correlação significativa entre motilidade e o teste supravital ( $r = 0,6$ ) e entre motilidade e o teste hiposmótico ( $r = 0,62$ ), o que de certa forma era esperado, devido ao fato de que doses inseminantes contendo espermatozoides com membrana plasmática íntegra e bioquimicamente ativa, apresentam também células com alta motilidade. O teste hiposmótico obteve uma correlação significativa com o teste supravital ( $r = 0,43$ ), o que já era esperado uma vez que ambos os testes avaliam a viabilidade das células espermáticas. Correa e Zavos (1994) em experimento com touros, obtiveram, para a solução de 100 mOsm/L, o número máximo de caudas enroladas ( $48,0 \pm 4,7\%$ ), e os resultados do corante supravital indicaram uma média de  $56,6 \pm 5,4\%$  de células com membrana íntegra. Estes autores observaram também alta correlação entre as porcentagens de células com membrana intacta e de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico ( $r = 0,81$ ;  $p < 0,05$ ).

Machos que apresentavam espermatozoides morfologicamente normais (eosina-nigrosina ensaio de mancha de exclusão) não obtiveram uma correlação

significativa com o número total de leitões nascidos ( $r=0,12$ ;  $p>0,05$ ). Entretanto, o número de leitões vivos por parto não foi correlacionada com estas qualidades do ejaculado (TSAKMAKIDIS et al., 2010).

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



## 5. CONCLUSÃO

Apesar das médias que avaliam a viabilidade dos espermatozoides diminuir de acordo com o aumento do tempo de armazenamento, o mesmo não aconteceu com o número total de fetos. A ordem de parto das matrizes não influenciou na média do número de leitões nascidos por leitegada. O reprodutor 4 integrante da linhagem comercial B apresentou as melhores médias em relação ao número total de fetos nascidos e quase sempre esteve no grupo de reprodutores que obtiveram as melhores médias para os testes de avaliação espermática.

Assim, uma maior viabilidade *in vitro* pode apresentar uma relação com a fertilidade *in vivo* e, portanto, é possível que as avaliações seminais realizadas em laboratório sejam utilizadas para uma diferenciação de machos com maior fertilidade, os quais poderiam ser selecionados antes de ingressar no plantel de reprodutores.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA, M.J.; RUEDA, M.; PERDIGÓN, R., Comparación de dos técnicas em la determinación de morfoanomalías del semen porcino. **Rev. Unellez de Cie. y Tec.**, v. 25, p. 32-39, 2007.
- AFONSO, J.B.A., LUCIA, T.Jr.; CORREA, M.N.; et al: Efeito da freqüência de inseminações artificiais por cio sobre o desempenho reprodutivo de porcas desmamadas precocemente. **In: X Congresso da ABRAVES 2001, Porto Alegre-RS. p. 267-268, 2001.**
- ALKIMIN, D.V., Efeito da fração do ejaculado e do método de conservação sobre as características físicas do sêmen suíno e a fertilidade da fêmea. **Dissertação (Mestrado)**. UFMG: Escola de Veterinária. 228f., 2010.
- ALVARENGA, A.L.N.; ZANGERONIMO, M.G.; OBERLENDER, G.; et al: Aspectos reprodutivos e estresse na espécie suína. Lavras: **Editora UFLA. Boletim Técnico**, n.86, p.1-40, 2011.
- ANDRADE, A. F. C.; ARRUDA, R. P.; COLEGHINI, E. C. de C., et al: Fluorescent Stain Method for the Simultaneous Determination of Mitochondrial Potential and Integrity of Plasma and Acrosomal Membranes in **Boar Sperm. Reprod Dom Anim**, v.42, p.190–194, 2007.
- ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C. de C.; ALONSO, M.A., et al: Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros, **Reprod Dom Anim**, Belo Horizonte, v.35, n.2, p.145-151, abr./jun. 2011.
- BACINOGLU, S.; TAS, M.; CIRIT, U. et al. The potential fertility estimation capacity of the hypoosmotic swelling test, the thermal stress test and a modified cervical mucus penetration test in the bovine. **An. Reprod. Sci.**, v.104, p.38-46, 2008.
- BARROS, T.B., Qualidade Espermática do Sêmen Suíno Conservado a Baixas Temperaturas em Diluentes Alternativos, Universidade Estadual do Ceará. **Dissertação (Mestrado)**, 79f. 2010.
- BENTO, E.A., Avaliação de algumas características reprodutivas e do peso ao nascer de granja suína do sudoeste goiano em duas épocas. Ilha Solteira, **Dissertação (Mestrado)** – Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista. 28f. 2003.

- BERNARDI, M.L., Tecnologias aplicadas no exame do ejaculado suíno para a produção de doses de sêmen de alta qualidade. **Acta Sci Vet**, v.36, p.5-16, 2008.
- BITTENCOURT, R.F., RIBEIRO FILHO A.L., SANTOS A.D.F. et al., Utilização do teste hiposmótico para avaliar a eficácia de diferentes protocolos de criopreservação do sêmen caprino. **Ci. Ani. Brasil.**, v.6, p.213-218, 2005.
- BLOM, E., Interpretation of spermatic cytology in bulls. **J Fertil Steril**, v.1, p.223-228, 1950.
- BLOM, E., Ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nord Vet Med**, v.25, p.383-391, 1973.
- BOLARÍN, A.; HERNÁNDEZ, M.; VAZQUEZ, J.M.; et al: Use of frozen-thawed semen aggravates the Summer-autumn infertility os artificially inseminated weaned sows in the Mediterranean region. **J of Animal Sci**, Vol. 87, pp. 3967-3975., 2009.
- BORCHARDT, N.G.; Wentz, I.; Bortolozzo, F.P., Fatores relacionados com o diagnóstico de estro e momento da ovulação - **Suinocultura em Ação 2**, p.107-126. Porto Alegre, 2005.
- BORTOLOZZO F.P., WENTZ I. & DALLANORA D. Avanços na inseminação artificial de suínos. **In: Anais dos Encontros Técnicos ABRAVES-RS (Estrela, Brasil).** pp.1-20. 2002.
- BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I.; DALLANORA, D., Situação atual da inseminação artificial em suínos. **Acta Sci Vet.** v.33 p.17- 32, 2005.
- BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I.; BENNEMANN, P.E.; et al: **Suinocultura em ação: Inseminação artificial na suinocultura tecnificada.** Copyright, Porto Alegre, Brasil, 185p, 2005.
- BORTOLOZZO, F.P.; GOLDBERG, A.M.G.; et al., Até onde é possível reduzir o número de espermatozoides empregados na inseminação artificial intra-cervical em suínos sem comprometer a fertilidade? **Acta Sci Vet**, v.36, p.17-26, 2008.
- BRAZ, V.B., influencia do diluidor, da temperatura de conservação e da taxa de diluição sobre a sobrevivência espermática in vitro do sêmen ovino resfriado. **Dissertação de mestrado** , PPGCV, 2003.

- BRITO, L.; BARTH, A.D.; BILODEAU – GOESSELS, S., et al: Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. **Theriogenology**, v.60, p.1539-1551, 2003.
- BRITO, L., Evaluation of stallion sperm morphology. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v.6, p.249-264, 2007.
- BROEKHUIJSE, M.L.W.J., SOSTARIC, E., FEITSMA, H., et al: Application of computer-assisted semen analysis to explain variations in pig fertility. **J of Ani Sci**, 2011.
- CBRA** - COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL: Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal 2aed. Belo Horizonte, 49 p, 1998.
- COLENBRANDER, B., Semen quality assessment, present and future. **In: Proceedings of the 4th International Conference on Boar Semen Preservation (Beltsville, U.S.A.)**. p.35-40 , 2000.
- CÓRDOVA-IZQUIERDO, A., MUÑOZ-MENDOZA, R., CÓRDOVA-JIMÉNEZ, S. et al., Características del semen de verraco y su evaluación práctica. **Porcinocultura**, 2004.
- CORRÊA, M.N.; MEINCKE W.; LUCIA J.R.T.; et al: Inseminação artificial em suínos. Copyright. Pelotas, Brasil, 194p. 2001.
- CORREA, J.R. ; ZAVOS, P.M., The hypoosmotic swelling test : it's employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen - thawed bovine sperm membrane . **Theriogenology**, v. 42, p . 351 - 360 , 1994.
- COSTA, E.P.; COSTA, A.H.A.; CARVALHO, F.F.; et al: Influencia do período quente do ano no tamanho da leitegada de matrizes suínas de granjas do estado de Minas Gerais. Congresso brasileiro de veterinários especialistas em suínos **In: Fortaleza. Resumos...** Fortaleza: ABRAVES, 2005.
- COSTI, G., Efeito de diluentes na qualidade de sêmen suíno armazenado a 17°C e no desempenho reprodutivo das fêmeas após a inseminação artificial, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. **Dissertação (Mestrado)**, 56f., 2003.
- CHRISTOVA, Y.; JAMES, P.S.; COOPER, T.G. et al. Lipid diffusion in the plasma membrane of mouse spermatozoa: changes during epididymal maturation, effects of pH, osmotic pressure and knockout of the c-ros gene. **J. And.**; v.23, p.384-392, 2002.

- CRESTANI, A. M., Visão empresarial da suinocultura contemporânea. **In:** SEMINÁRIO NACIONAL DE SUINOCULTURA, Concórdia. Anais... Concórdia: EAF Concórdia, p. 16-17. 1995.
- DALLANORA, D.; Bernardi, M.L.; Wentz, I.; et al: Intervalo desmame-estro e anestro pós-lactacional em suínos. **In:** Bortolozzo, F.P.; Wentz, I. (Eds). Suinocultura em Ação.1, 80p. Porto Alegre, 2004.
- 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. **Int Jof Andv.**29, p.543-552, 2006.
- DE LEEUW, F.; COLENBRANDER, B.; VERKLEIJ, A., The role membrane damage plays in cold shock and freezing injury. **Reprod. Dom. Anim.**, suppl., v.1, p.95-104, 1990.
- DOTT, H., Morphology of stallion spermatozoa. **J Reprod Fertil**, v.23, p.41-46, 1975.
- DUCCI, M.; GAZZANO, A.; VILLANI, C.; et al: Membrane integrity evaluation in rabbit spermatozoa. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v.102, p.53-56, 2002.
- DYCK, M.K., FOXCROFT, G.R., NOVAK, S., et al: Biological markers of boar fertility. **Reprod in Domestic Ani**, v.46, p.55-58, 2011.
- FERREIRA, F. M. et al. Comportamento de monta e características seminais de suínos jovens landrace e large white. **Cienc. Rural**, Santa Maria-RS. v. 35, n. 1, pp. 131-137, 2005.
- FLOWERS, W.L., Increasing fertilization rate of boars : Influence of number and quality of spermatozoa inseminated. **J of Ani Sci**, v. 80, p. E47-E53, 2002.
- 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., CAMERON, A., et al.: Application of advanced AI technologies to improve the competitiveness of the pork industry. **In:** Proceedings of the 21 IPVS CONGRESS, Vancouver, Canada. p. 25-29. 2010.
- GADEA J., MATAS C. & LUCAS X., Prediction of porcine semen fertility by homologous in vitro penetration hIVP/assay. **Ani Reprod Sci**. v.56, 95-108. 1998.
- GADEA, J.; MATAS, C. Sperm factors related to in vitro penetration of porcine oocytes. **Theriogenology**, v.54, p.1343–1357, 2000.
- GADEA, J. Review: Semen extenders used in the artificial insemination of swine. **Spanish J. Agr. Res.**, v.1, p.17-27, 2003.

- GADEA, J., SELLES, E., MARCO, M. A., Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation. Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. **Theriogenology** 62, 690–701. 2004.
- GAGGINI T. S.; MURGAS L. D. S.; ZANGERONIMO M. G., Seleção de Reprodutores Suínos, **Boletim Técnico número 81**, Universidade Federal de Lavras – UFLA, Departamento de Medicina Veterinária p.1-14, 2008.
- GUIMARÃES, S.E.F.; PINHO, R.O.; SHIOMI, H.H. et al: Avaliação de diferentes soluções e tempos de incubação no teste hiposmótico do sêmen congelado/descongelado de suínos da raça Piau. In: 15o Congresso da ABRAVES, 2011, Fortaleza-CE, Anais... Fortaleza, 2011.
- GRANEMANN, L.C., Avaliação Comparativa do Sêmen Eqüino Colhido com Vagina Artificial e por Lavado Intraluminal da Cauda do Epidídimo Pós-Orquiectomia; **Dissertação** (Mestrado em Ciências Veterinárias - Setor de Ciências Agrárias), Universidade Federal do Paraná – Curitiba, 2006.
- HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B., **Reprodução Animal**. São Paulo, Brasil Manole, 7ed, 2004.
- HANCOCH, J.L., The morphology of boar spermatozoa, **J. Roy. Microsc. Sco.** V.76, p.84-97, 1957.
- HANCOCK J.L.; HOVELL, G.Jr., The collection of boar semen. **The Veterinary Record** v.71, p.664-665, 1959.
- HIRAI, Misawa. Objectively measured sperm motility and sperm head morphometry in boars (*Sus scrofa*): relation to fertility and seminal plasma growth factors. **J of And.** V.22 p.104-110, 2001.
- HOFMO, P.O., Commercial swine AI with liquid semen in Norway. In: International Conference on Boar Semen Preservation. Beltsville, Maryland USA. Proceedings... Beltsville, p.317-324. 1991.
- HOLT, W.V., Basic aspects of frozen storage of semen. **Ani Reprod Sci**, v. 62 p.3-22, 2000.
- JEYENDRAN, R.; VAN DER VEN, H., Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **J. Reprod. Fertil.**, p.219-228, 1984.
- JOHNSON, L.A.; WEITZE, K.F.; FISER, P.; et al.: Storage of boar semen. **Ani Reprod Sci**, v.62, p.143-172. 2000.

- KUMMER, A. B. H. P., Uso de análise multivariada para determinar a associação do desempenho reprodutivo de machos suínos com as características seminais. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. **Dissertação (Mestrado)**. 64f. 2012.
- LEVIS, D.G., Production Management: Managing post-pubertal boars for optimum fertility. **Swine Med.** p. 17-23, The Compendium January 1997.
- LEVIS, D. Liquid boar semen production: current extender technology and where do we go from here! **In:** International Conference on Boar Semen Preservation. 4., 2000, Beltsville, Maryland USA. Proceedings... Beltsville, p.121-128, 2000.
- LIMA, J. A. F., OLIVEIRA, A. I. G., FIALHO, E. T., **Suinocultura técnica**. Lavras: UFLA/FAEPE. 203p., 1999.
- LIU, Z.; FOOTE, R.H., Bull sperm motility and membrane integrity in media varying in osmolality. **J. Dai. Sci.**, v.81, p.1868-1873, 1998.
- MACEDO, D. B.; COSTA, D. S.; PAULA, T. A. R.; et al: Testicular biometry of free-ranging feral pigs (*Sus scrofa* sp). **Rev Bras de Saúde e Produção Animal**, v. 12, n. 2, p. 381-388, abr./jun. 2011.
- MARQUES, M., Avaliação espermática e redução do número de espermatozoides por dose inseminante, **In:** IV Simpósio Brasil Sul de Suinocultura, Chapecó, SC, p.40-56, agosto de 2011.
- MARTINS, T. D. D.; COSTA, A. N.; SILVA, J. H. V.; et al:Efeitos da ordem de parto sobre as características das leitegadas ao parto provenientes de matrizes mantidas em ambiente quente. **In:** CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUINOS. 12, 2005, Fortaleza. Resumos... Fortaleza: ABRAVES, 2005.
- MARTINS, L. F.; PINHO, R. O.; PARAIZO, R. M., et al.: Avaliação de diferentes osmolaridades de soluções hiposmóticas e tempos de incubação no teste hiposmótico do sêmen de touros Nelore, **Rev Bras de Zoo**, v.40, n.7, p.1519-1525, 2011.
- MATOS, D.L., Sobrevivência *in vitro* e fertilidade do sêmen suíno diluído a diferentes taxas de diluições e conservado a 17 °C, Universidade Estadual do Ceará, **Dissertação (Mestrado)**, 79f. 2008.
- MATOS, J.M., **Tópicos relevantes na suinocultura atual**. Campo Grande: UCB, 64p. 2008.

- MELLAGI, A.P.G.; Protocolos de Detecção de Estro e Inseminação Artificial em Suínos, **In: IV Simpósio Brasil Sul de Suinocultura - Chapecó, SC - Brasil**, p.26-39, 9 a 11 de agosto de 2011.
- MELO, M.I.V.; HENRY, M., Teste hiposmótico na avaliação de sêmen eqüino. **Arq Bras de Vet e Zoo**, v.51, n.1, p.71-78, 1999.
- MELO, M.I.V., HENRY, M., BEKER, A.R.C.L., Teste hiposmótico para avaliação da viabilidade do sêmen equino resfriado com diferentes diluidores, **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.57, n.6, p.757-763, 2005.
- MORETTI, A.S.; FALLEIROS, F.T.; ABRAHÃO, A.A.F.; et al:Qualificação da produção de suínos. **Rev Pork World**, ano 5 , n. 28, p. 38-42, 2005.
- NISHIKAWA, Y., Studies on reproduction in horses. Tokyo: Japan, **Racing Association**, 340p., 1959.
- NOAKES D. E.; PARKINSON T. J.; ENGLAND G. C. W., Veterinary Reproducion and Obstetrics, 8.ed. **Saunders**, 2001.
- OBERST, E.R.; JOBIM, M.I.M.; MATTOS, R.C.; et al., Teste hiposmótico e sua relação com outros métodos da avaliação da integridade da membrana espermática de carneiro. **Rev. Bras. Reprod. Ani.**, v.27, p.375-376, 2003.
- OHATA, P.M. A influência do período de equilíbrio, do plasma seminal e da sensibilidade dos machos ao resfriamento na congelabilidade do sêmen suíno. **Dissertação (Mestrado)**. Faculdade de Veterinária da UFRGS, Porto Alegre, Brasil, 81f. 2001.
- PEJASK, Z. Some pharmacological methods to reduce intrapartum death of piglets. **Pig news and information**, v.5, p.35-37, 1984.
- PEREZ.LLANO, B.; LORENZO, J.; GARCÍA-CASADO, P.; et al: Study of the relationship between HOST and fertility in boar semen. **Boar Semen Preservation IV. Johnson LA,Guthrie HD** (eds) 256p., 1999.
- 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.
- PINTADO, B.; FUENTE, J.; ROLDAN, E.R.S., Permeability of boar and bull spermatozoa to the nucleic acid stains propidium iodide or Hoechst 33258, or to eosin: accuracy in the assessment of cell viability. **J of Rep and Fert**, v.118, p.145-152, 2000.



- PRIVADO FILHO, J.R.; TONIOLLO, G.H., Aspectos reprodutivos de fêmeas suínas primíparas e secundíparas em Rio Verde - Goiás. **ARS Veterinaria, Jaboticabal, SP**, v.27, n.1, 107-116, 2011.
- RAO, A., Ramamohana. Changes in the morphology of sperm during their passage through the genital tract in bulis with normal and impaired spermatogenesis. 1971. 83f. Thesis (PhD) - Royal Veterinary College, Stockholm, 1971. **Resumo em Anim Breed Abstr**, v.39, p.3254, 1971.
- REIS, G.R.; OHATA, P.M.; SCHWARZ, P.; et al: Identificação de cachacos com diferentes períodos de viabilidade in vitro. **In:** Simpósio Internacional Minitub "Inseminação Artificial em Suínos". Flores da Cunha-RS. Anais... Flores da Cunha, p.42-49. 2000.
- REIS G.R., Avaliação de machos suínos: sensibilidade ao resfriamento e capacidade de ligação espermática a um substrato sintético. Porto Alegre, RS. **Tese (Doutorado)**-Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul., 112f. 2002.
- REVELL, S.G; MRODE, R.A., An osmotic resistance test for bovine semen. **Anim Reprod Sci**, v.36, p.77-86. 1994.
- RIBEIRO, J.C.; CARVALHO, E.C.; NEPOMUCENO, R.C., Efeito da ordem de parto sobre o número de leitões nascidos vivos e totais em fêmeas suínas, **ZOOTEC**, João Pessoa, PB - Universidade Federal da Paraíba - UFPB, 2008.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; SARAVIA, F.; WALLGREN, M.; et al., J.J., Boar spermatozoa in the oviduct. **Theriogenology**, v.63, 514-535, 2005.
- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H., Can we increase the estimative value o semen assessment, **Reprod Dom Anim**. v.41, p. 2-10, 2006.
- RUIZ-SANCHEZ, A.L.; O'DONOGHUE, R.; NOVAK, S., et al: The predictive value of routine semen evaluation and IVF technology for determining relative boar fertility. **Theriogenology**, v.66 p.736-748. 2006.
- SALVINO, M.B., SOUZA, J.A.T., VIDIGAL, K.F., Efeito da Fixação do Sêmen Pós-Teste Hiposmótico para avaliação da Membrana Espermática de Caprinos, **Rev CieElet de Med Vet**, Ano IX – Número 16 – Janeiro de 2011.
- SÁNCHEZ, R.S., Conceito e fundamento dos diluentes utilizados na inseminação artificial de suínos. **Suínos, Cia**, n.2, p.18-22, 2003.

- SARAVIA, F.; WALLGREN, M.; NAGY, S., Deep freezing of concentrated boar semen for intra-uterine insemination: effects on sperm viability. **Theriogenology**, v.63, p.1320–1333, 2005.
- SATHER, A.P.; HARBISON, D.S.; SETH, P.C., A note on the influence of storage duration of fresh semen on fertilizing capacity and embryo survival in sows. **AniProd**, v.52, p.554-557. 1991.
- SCHEID, W., WEBER, J., Traut, H. and GABRIEL, H.W. Chromosome aberrations induced in the lymphocytes of pilots and stewardesses. *Naturwissenschaften* v.80. p. 528-530. 1993.
- SCHEID, I.R., Transportando e armazenando corretamente as doses de sêmen. **Suíno & Cia**, n.2, p. 25-31, 2003.
- SCHENKEL, A.C.; KUMMER, R.; SCHIMIDT, Caracterização dasíndrome do segundo parto em suínos. **In: XII Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos Anais**. Fortaleza, CE, p.252-253. 2005.
- SCHENKEL, A. C.; BERNARDI, M. L.; BORTOLOZZO, F. P., et al:Quais as principais características das fêmeas que manifestam a síndrome do segundo parto?. **Acta Sci Vet**. 35(Supl.): S63-S72, 2007.
- SILVA, L. D. M., Avanços na inseminação artificial na espécie canina. **Rev Bras de Rep Ani**, v.24, n.4, p.194-201, 2003.
- SILVEIRA, P.R.S.; CESCNETO, R.J.; ZANELLA, E.L., Inseminação Artificial de Suínos: Inseminar duas vezes durante o estro é suficiente? - **Comunicado Técnico** - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA, Concórdia-SC, 2004.
- SONDERMAN , J.P.; LUEBBE, J.J., Semen production and fertility issues related to differences in genetic lines of boars. **Theriogenology** v.70, p.1380-1383, 2008.
- STEN-KNUDSEN, O. *Biological Membranes: Theory of transport potentials and electric impulses*. 1ed. Cambridge: **Cambridge University Press**, 671p., 2002.
- STRYER L.; Tymoczko J.L.; Berg J.M., *Bioquímica*. 5.ed. Rio de Janeiro:Guanabara **Koogan**, 1059p. 2004.
- SWANSON, E. W.; BEARDEN, H. J., An eosin/nigrosin stain for differentiating live and dead spermatozoa. **J Anim Sci**, v.10, p.981-987, 1951.
- TAKAHASHI, K.; UCHIDA, A.; KITAO M., Hypoosmotic swelling test of sperm. **Arch Androl**, v.25, p.225-242, 1990.

- TARTAGLIONE, C.M.; RITTA, M.N., Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v.62, p.1245-1252, 2004.
- TSAKMAKIDIS, I.A.; LYMBEROPOULOS, A.G.; KHALIFA, T.A.A., Relationship between sperm quality traits and field-fertility of porcine semen. **J of Vet Sci**, v.11, p.151-154, 2010.
- XU, X.S.; POMMIER, T.; ARBOV, B., et al: In vitro maturation and fertilization techniques for assessment of semen quality and boar fertility. **J. Anim. Sci.**v.76 p.3079–3089. 1998.
- WABERSKI, D.; WEITZE, K.F.; LIETMANN, C.; et al: The initial fertilizing capacity of long-term-stored liquid boar semen following pre-and postovulatory insemination. **Theriogenology**, v.41, p.1367-1377, 1994.
- WABERSKI, D.; PETRUNKINA, A.M.; TÖPFER-PETERSEN, E., Can external quality control improve pig AI efficiency? **Theriogenology**, v.70, p.1346–1351, 2008.
- WATSON, P.F., Recent development and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reprod Fertil Dev**, v.7, p.871-891, 1995.
- WATSON, P.F. & BEHAN J.R. Intrauterine insemination of sows with reduced sperm numbers: results of a commercially based field trial. **Theriogenology**. 57: 1683-1693. 2002.
- WEITZE, K.F., Long-term storage of extender boar semen. **Reproduction in Domestic Animals**, Suppl.1, p.231-253. 1991.

## ANEXO

Artigo submetido a revista *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*.

**PARÂMETROS ESPERMÁTICOS E TAXA DE FERTILIDADE DE FÊMEAS  
SUÍNAS DE UMA LINHAGEM COMERCIAL**  
*Sperm parameters and fertility rate of females of a Commercial Pig Line*

D.M.A. Lima<sup>a</sup>, R.O. Pinho<sup>b</sup>, H.H. Shiomi<sup>c</sup>, H.T. Silva<sup>b</sup>, S.E.F. Guimarães<sup>b</sup>, J.D.  
Guimarães<sup>c</sup>, P.S. Lopes<sup>b</sup>, J.B. Siqueira<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Veterinary Medicine Department of Federal University of Espírito Santo (UFES);

<sup>b</sup>Animal Science Department of Federal University of Viçosa (UFV);

<sup>c</sup>Veterinary Medicine Department of Federal University of Viçosa (UFV);

### RESUMO

Objetivou-se com este trabalho caracterizar o padrão seminal de reprodutores suínos de 2 linhagens comerciais e relacionar as avaliações seminais com a taxa de fertilidade dos reprodutores através de inseminações artificiais. O desempenho reprodutivo de quatro varrões de duas linhagens comerciais (A e B), foi obtido através de avaliações físicas (motilidade, vigor), morfológicas e também através de análises complementares para verificar a viabilidade da membrana plasmática (teste supravital e hiposmótico). Durante o período de 10 meses foram inseminadas 322 fêmeas incluindo múltiparas e marrãs. Dentre os quatro machos avaliados, o macho 4 (da linhagem comercial B) esteve no grupo que obteve os melhores resultados no que diz respeito às avaliações espermáticas e com isso, foi o reprodutor que apresentou o melhor desempenho reprodutivo, obtendo  $15,8 \pm 3,2$  leitões nascidos por leitegada. Por outro lado, o macho 1 da linhagem comercial A esteve no grupo que apresentou

os piores índices nas avaliações espermáticas, apresentando também o pior desempenho em relação à fertilidade com  $11,7 \pm 2,8$  leitões nascidos por leitegada. Os valores encontrados nos testes que avaliam a viabilidade da membrana plasmática dos espermatozoides logo após a diluição (tempo 0h) foram superiores aos encontrados nas doses que passaram pelo processo de resfriamento ( $p < 0,05$ ). A motilidade caiu de 84,0% para 78,6% após 12 horas de resfriamento. A integridade física da membrana plasmática avaliada pelo teste supravital caiu de 92,5% para 85,9%, e a atividade bioquímica da membrana plasmática avaliada pelo teste hiposmótico caiu de 87,2% para 76,9% após 12 horas de estocagem. Já o valor referente ao número total de fetos nascidos (14,9) encontrado no tempo (0h) diferenciou ( $p < 0,05$ ) daqueles encontrados após 12, 36 e 60 horas de armazenamento (13,0; 12,5; e 12,6 respectivamente), e foi semelhante ( $p > 0,05$ ) aos encontrados após 24, 48 e 72 horas de armazenamento (14,6; 13,6; e 14,2 respectivamente).

Palavras-chave: Fertilidade; Suíno; Testes complementares

### **ABSTRACT**

The aim of this study was to characterize the seminal pattern of two boars of two commercial pig lines and correlate the seminal evaluations with the fertility rate of them through artificial inseminations. The reproductive performance of the four boars from two commercial lines (A and B), was obtained through physical assessments (motility, vigor), morphological and also through additional analyzes to verify the feasibility of the plasma membrane (supravital and hypoosmotic test). During the period of 10 months 322 females were inseminated, including gilts and sows. Among the four boars evaluated, the boar 4 (the second of commercial line B) was in the group that got the best results regarding to spermatic evaluations and due to this was the boar who had the best reproductive performance, achieving  $15.8 \pm 3.2$  piglets per litter. On the other hand, the boar one (the first of commercial line A) was in the group with the worst rates in sperm evaluations showing the worst performance in relation to fertility with  $11.7 \pm 2.8$  piglets per litter. The values found in tests assessing the viability of the sperm plasma membrane immediately after dilution (time 0h) were higher than those found in the doses that passed through cooling ( $p < 0.05$ ) process. The motility decreased from 84.0% to 78.6% after 12 hours of cooling. The physical integrity of the plasma membrane assessed by supravital test dropped from 92.5% to 85.9%, and the biochemical activity of plasma membrane evaluated by hypoosmotic test dropped from 87.2% to 76.9% after 12 hours of storage. The value for the total number of fetuses born (14.9) found in time (0h) differed ( $p$

<0.05) than those found after 12, 36 and 60 hours of storage (13.0, 12.5, and 12.6 respectively) and was similar ( $p > 0.05$ ) to those found after 24, 48 and 72 hours of storage (14.6, 13.6, and 14.2 respectively).

## 1. INTRODUÇÃO

Na suinocultura, os reprodutores são animais de grande valor, fundamentalmente por representarem o material genético disponível para a produção de leitões, e por esta razão deve-se estar atento para que não haja influência direta dos machos sobre as taxas de fertilidade do rebanho (Gaggini, 2008).

Neste sentido, desde o início do século XXI, cientistas têm procurado intensamente desenvolver ensaios laboratoriais para prever a fertilidade do sêmen. Contudo, tais metas têm sido de difícil obtenção, uma vez que a maior parte dos problemas reside nos diferentes atributos que os espermatozoides devem possuir para fertilizar o ovócito (Arruda, 2011).

Desta forma, a motilidade, o vigor, a concentração e a morfologia espermáticas são considerados os parâmetros clássicos na avaliação de amostras de sêmen (fresco, resfriado ou congelado). Entretanto, estudos reportam que este tipo de análise é impreciso, pois mesmo quando executada por investigadores experientes, as análises são influenciadas por uma alta variação entre observações e observadores. Esta imprecisão deriva, em parte, da natureza subjetiva dos testes usados, da variabilidade entre técnicos e das diferenças na implementação de padrões para a avaliação (Arruda, 2011).

Um dos principais parâmetros a ser considerado na avaliação da fertilidade do macho, ou na análise dos métodos de preservação espermática, é o estudo da viabilidade dos espermatozoides (Pintado et al., 2000), sendo que testes para avaliar a integridade da membrana plasmática do espermatozoide incluem a permeabilidade a corantes e a análise da função bioquímica, cujos resultados variam de acordo com o método utilizado (Brito et al., 2003).

A integridade da membrana plasmática é um requisito essencial para o metabolismo e função espermática e ainda pode ser avaliada com a coloração eosina-nigrosina ou com uso de sondas fluorescentes (Bernardi, 2008). Já o teste hiposmótico foi desenvolvido para avaliar a atividade bioquímica da membrana plasmática (Revell e Mrode, 1994).

Considerando que a qualidade do sêmen é de grande importância para a inseminação artificial (IA) das porcas e conseqüente produção de um número ótimo de leitões, os testes

complementares (parâmetros seminais) podem ser correlacionados com o número de leitões nascidos a partir da técnica de IA. Desta forma, objetivou-se com este trabalho caracterizar o padrão seminal de reprodutores suínos de 2 linhagens comerciais e relacionar as avaliações seminais com a taxa de fertilidade dos reprodutores através de inseminações artificiais.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi realizado na Granja de Melhoramento Genético de Suínos (GMS) do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa-MG (GMS-DZO-UFV), que tem como coordenadas geográficas o paralelo de “20°45’14”, latitude S, e o meridiano de “42°52’54”, longitude W. O clima é do tipo tropical de altitude, com chuvas durante o verão e temperatura média anual em torno de 19°C, com variações entre 10°C (média das mínimas) e 23°C (média das máximas).

Foram realizadas avaliações das características seminais de quatro varrões de duas linhagens (A e B) comerciais (dois varrões de cada linhagem) com idades variando de 2 a 3 anos. Os Varrões 1 e 2 pertenciam à linhagem A e os varrões 3 e 4 à linhagem B.

Foram utilizadas 80 fêmeas reprodutivas que compuseram o plantel de matrizes da referida granja experimental – DZO-UFV. O manejo reprodutivo empregado foi o de inseminação artificial, entre os meses de dezembro de 2012 a Setembro de 2013. Durante o período experimental, as fêmeas que retornaram ao cio após as IAs ou aquelas que foram desmamadas integraram o grupo de animais a serem inseminadas, computando assim no total de repetições no modelo experimental.

Foi feita a observação do cio duas vezes por dia (a primeira às 7:00 e a segunda às 17:00), levando o rufião até as baias onde ficaram alojadas as fêmeas não gestantes.

Foi utilizado um protocolo de duas inseminações. Para porcas adultas, a primeira IA foi realizada 12 horas após a identificação do cio e a segunda 24 horas após a primeira, totalizando duas IAs por estro, independente da continuidade do estro após a 2ª IA. Para marrãs, a primeira IA também foi realizada 12 horas após a identificação do cio mas a segunda foi realizada 12 horas após a primeira, totalizando duas IAs por estro, independente da continuidade do estro após a 2ª IA.

Foram formados lotes variando de 12 a 16 matrizes em função do número de baias na maternidade. As duas inseminações realizadas por estro foram efetuadas com sêmen de um mesmo varrão e em cada lote de fêmeas, foram selecionados aleatoriamente no máximo dois varrões.

As porcas não gestantes foram criadas em baias coletivas de 16m<sup>2</sup> até que se o cio fosse detectado e, após, foram transferidas para as gaiolas para que a IA fosse realizada com segurança. Foram fornecidos 2,5 Kg/dia de ração balanceada para as porcas adultas vazias contendo 12% de Proteína Bruta (PB) e 2,5 Kg/dia de ração com 14% de PB para porcas adultas gestantes. Para marrãs o teor de PB da ração foi o mesmo para porcas adultas o que variou foi a quantidade, que foi de 1,8Kg/dia de ração.

Já para as porcas da maternidade (lactantes) foram fornecidos 4 tratamentos por dia. Para cada, foram fornecidos às fêmeas 2kg de ração, sendo esta quantidade ajustada de acordo com o consumo das matrizes.

Os varrões foram criados em condições intensivas, em baias individuais de 3 x 4 m (12m<sup>2</sup>) por animal, com fornecimento de 4 kg/dia de ração balanceada para reprodutores com 15 % de PB.

A coleta de sêmen foi realizada pelo método da estimulação com a mão enluvada (Hancoch & Hovell, 1959) e auxílio de um manequim móvel. Após a monta, foi efetuado o desvio peniano, realizando-se pressão digital intermitente na glândula até que ocorresse a ereção e ejaculação completa.

Os ejaculados foram coletados em copos plásticos descartáveis de 700 mL, devidamente esterilizados, protegidos em embalagens térmicas previamente aquecidas a 38°C e montadas com dupla camada de gaze, fixadas ao copo com barbante, para reter a fração gelatinosa do sêmen.

Após a coleta do sêmen foi realizada a pesagem do mesmo para se obter o volume do ejaculado e realizar os procedimentos necessários para a preparação das doses inseminantes. Com o sêmen já pesado foi realizada a primeira diluição que foi feita adicionando a mesma quantidade de diluente que a do sêmen (diluição 1:1). O diluente que foi utilizado é o Beltsville Thawing Solution - BTS (Bretanha ®).

Posteriormente foi realizada a contagem dos espermatozoides na câmara de Neubauer para saber qual a concentração do ejaculado e preparar as doses inseminantes. Cada dose inseminante continha 100 mL (sêmen mais diluente) e uma concentração de 3 bilhões de espermatozoides.

No sêmen *in natura* e resfriado, foram realizadas as avaliações física e morfológica por meio da avaliação da motilidade espermática total, vigor espermático, coloração supra vital e teste hiposmótico. O sêmen *in natura* foi avaliado no ato da coleta e toda vez que houve a necessidade de inseminar as porcas, o sêmen resfriado foi avaliado pelo mesmo procedimento do sêmen *in natura*, utilizando-o ainda, quando manteve condições adequadas



para alcançar índices reprodutivos desejáveis, 50% de motilidade e 2,5 de vigor preconizados pelo CBRA (1998) para sêmen resfriado

Para a avaliação física, uma gota de sêmen foi colocada entre lâmina e lamínula, previamente aquecidas a 38°C e em aumento de 400x foram avaliados a motilidade espermática total (MOT; %) e o vigor espermático (VIG; 0 – 5) (CBRA, 1998).

Em um tubo contendo 1mL de formol-salino tamponado, pré-aquecido a 38°C (Hancoch, 1957) foram acondicionadas alíquotas do ejaculado suficientes para turvar a solução, para análise morfológica dos espermatozoides por meio de preparação úmida, com auxílio de microscopia de contraste de fase em aumento de 1000x (sob uma gota de óleo de imersão). Foram contabilizadas 200 células por ejaculado, para determinar o percentual de espermatozoides normais e de anomalias de acrossoma, cabeça, peça intermediária e cauda, tal como preconizado pelo CBRA (1998) e classificados em defeitos espermáticos maiores (DEFM), menores (DEFMEN) e totais (DEFT), conforme os critérios preconizados por Blom (1973).

A coloração supravital foi utilizada para avaliação da integridade física da membrana plasmática, utilizando solução de eosina (1%) e nigrosina (5%), conforme descrito por Swanson & Bearden (1951). Após a confecção de um esfregaço em lâmina pré-aquecida a 38°C, foram contabilizadas 100 células espermáticas (aumento de 400x). As células íntegras permaneceram sem corar e aquelas com danos à membrana coraram-se de rosa avermelhado.

Para o teste hiposmótico, foi utilizada solução de sacarose com osmolaridade de 100 mOsm/kg com 30 minutos de período de incubação a 37°C. Depois do período de incubação, foi acrescentado 0,5 mL de solução formol salina tamponada para a fixação dos espermatozoides e posteriormente foi feita a análise em microscopia de contraste de fase. Foram contabilizados 100 espermatozoides em aumento de 1000X e obtido o percentual de espermatozoides com flagelo curvado junto à membrana expandida. Em seguida foi calculada a porcentagem de espermatozoides reativos, subtraindo do percentual de flagelos dobrados registrados no sêmen in natura ou resfriado pelo percentual obtido no teste hiposmótico (Melo & Henry, 1999).

Após o parto foram contabilizados e registrados em uma planilha o número total de leitões nascidos, o número de leitões nascidos vivos, o número de leitões natimortos e o número de leitões mumificados.

Para análise estatística foi empregado o programa estatístico SAEG 9.1 (SAEG, 2007). Estatística descritiva (média, desvio-padrão) foi utilizada para todas as variáveis estudadas (motilidade e vigor espermáticos, defeitos espermáticos e integridade de acrossoma e

membrana plasmática). Os dados referentes às avaliações físicas e morfológicas do sêmen foram submetidos aos testes de Lilliefors e Cochran-Bartlett para verificar a normalidade dos dados e a homogeneidade das variâncias e posteriormente submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste F para verificar o efeito das duas linhagens comerciais. Os dados referentes a fertilidade dos sêmens empregados foram avaliados por meio da taxa de parição por meio do arranjo dos dados em tabela de contengência e comparados pelo teste de qui-quadrado. A prolificidade ou número de leitões nascidos foi avaliada por meio da análise de variância, verificando o efeito dos varrões das duas linhagens comerciais empregadas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados registrados para as características físicas do sêmen, morfológica dos espermatozoides e testes complementares realizados nos quatro varrões utilizados neste estudo estão sumariados na Tab. 1.

Tabela 1: Média e desvio-padrão das características reprodutivas de varrões de duas linhagens comerciais.

Características	Varrão				Total
	1	2	3	4	
Motilidade (%)	69,0±8,0(82) <sup>c</sup>	72,6±7,8(80) <sup>b</sup>	74,0±8,1(56) <sup>ab</sup>	76,2±6,8(104) <sup>a</sup>	73,1±8,1(322)
Vigor (1-5)	2,8±0,4 <sup>c</sup>	3,0±0,4 <sup>b</sup>	3,2±0,4 <sup>ab</sup>	3,3±0,4 <sup>a</sup>	3,1±0,5
[ ]/mL <sup>*</sup>	476,9±176,3 <sup>a</sup>	625,0±399,0 <sup>a</sup>	354,6±137,4 <sup>b</sup>	412,2±249,8 <sup>b</sup>	471,5±282,3
[ ]/ejaculado <sup>*</sup>	61,6±21,0 <sup>b</sup>	102,6±56,8 <sup>c</sup>	62,8±19,3 <sup>b</sup>	98,2±53,9 <sup>a</sup>	83,8±47,6
DEFM <sup>*</sup>	5,7±3,5 <sup>a</sup>	4,0±3,4 <sup>b</sup>	2,4±1,8 <sup>c</sup>	4,1±2,9 <sup>b</sup>	4,2±3,2
DEFMEN <sup>*</sup>	3,9±1,9 <sup>a</sup>	3,1±1,6 <sup>a</sup>	2,0±1,2 <sup>b</sup>	3,1±2,0 <sup>a</sup>	3,1±1,9
DEFT <sup>*</sup>	9,6±4,5 <sup>a</sup>	7,1±4,4 <sup>b</sup>	4,4±2,3 <sup>c</sup>	7,2±4,2 <sup>b</sup>	7,3±4,4
Supravital (%) <sup>*</sup>	78,5±9,2 <sup>b</sup>	80,7±8,6 <sup>ab</sup>	82,8±9,4 <sup>a</sup>	82,3±12,2 <sup>a</sup>	81,0±10,3
Hiposmótico(%) <sup>*</sup>	62,5±12,4 <sup>b</sup>	59,6±11,5 <sup>b</sup>	71,1±16,2 <sup>a</sup>	70,6±15,1 <sup>a</sup>	66,4±14,5
Total de fetos	11,7±2,8(82) <sup>c</sup>	13,1±2,9(80) <sup>b</sup>	13,8±2,6(56) <sup>ab</sup>	15,8±3,2(104) <sup>a</sup>	13,7±3,3(322)

<sup>a,b</sup>Médias de valores na mesma linha, seguidas de letras minúsculas diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05); \* <sup>a,b</sup>Médias de valores na mesma linha, seguidas de letras minúsculas diferem entre si pelo teste de Kruskal – Wallis (p<0,05); Média±dp( ) = Média, desvio padrão e número de observações; [ ]/mL: concentração espermática/mL x 10<sup>6</sup>; [ ]/ejaculado: concentração espermática/ejaculado x 10<sup>9</sup>; DEFM: % de defeitos maiores; DEFMEN: % de defeitos menores; DEFT: % de defeitos totais.

Os melhores resultados foram registrados para os machos da linhagem B (varrões 3 e 4). O varrão 4 apresentou os melhores valores de viabilidade espermática e também no número total de fetos (p<0,05) em relação aos varrões 1 e 2 (Tabela 1). É esperado um maior número de fetos nascidos quando existe boa viabilidade espermática devido a uma capacidade

melhor, da célula que permanece íntegra, em fertilizar o ovócito. Desta forma, pode-se observar que o macho 1 da linhagem comercial A apresentou os piores valores referentes à motilidade ( $p < 0,05$ ), além de diferir dos reprodutores da linhagem B no teste supravital ( $p < 0,05$ ), podendo ser a causa dos piores resultados encontrados para o número total de fetos nascidos ( $p < 0,05$ ) quando comparado com os demais reprodutores. Porém o macho 2, de mesma linhagem, diferiu apenas no teste hiposmótico dos machos 3 e 4, integrante da linhagem comercial B. Portanto, os resultados apresentados na tabela 1 representam bem a possibilidade de selecionar machos a partir dos resultados *in vitro* de testes que avaliam a viabilidade dos espermatozoides.

De acordo com Foxcroft et al. (2008), esta informação permite comparar o potencial reprodutivo de cachaços submetidos a uma avaliação *in vivo*. Nesta metodologia comparam-se os resultados referentes à taxa de parto e ao número de nascidos totais entre diferentes cachaços submetidos ao mesmo protocolo de inseminação artificial e critério de avaliação laboratorial do ejaculado. Dados de Foxcroft et al. (2010) demonstraram que a média de nascidos totais de 31 reprodutores foi de 12,26 leitões, entretanto quando foram removidos da análise todos os reprodutores com resultados abaixo da média da população (9 reprodutores), a média de nascidos totais foi para 13,29 leitões.

Quando há maior variação nas características seminais, a associação com os dados de fertilidade parece ser mais facilmente detectada (Bernardi, 2008). Apesar da diferença encontrada em relação às anormalidades espermáticas entre os reprodutores do presente estudo, estas estão dentro dos limites aceitáveis, conforme preconizado pelo CBRA. As médias e desvios-padrão das características reprodutivas dos quatro varrões utilizados neste estudo, agrupadas de acordo com o tempo de resfriamento do sêmen, avaliado de 12 em 12 horas (0 a 72 horas) estão sumariados na Tab. 2.

Tabela 2: Média e desvio-padrão das características reprodutivas de quatro varrões avaliados pós-diluição do sêmen no momento das inseminações artificiais.

<i>Características</i>	<i>0</i>	<i>12</i>	<i>24</i>	<i>36</i>	<i>48</i>	<i>60</i>	<i>72</i>	<i>TOTAL</i>
Motilidade (%)	84,0±5,1 <sup>a</sup>	78,6±3,4 <sup>b</sup>	77,0±5,4 <sup>bc</sup>	73,3±3,6 <sup>cd</sup>	68,9±3,3 <sup>de</sup>	66,4±2,4 <sup>c</sup>	69,4±6,2 <sup>dc</sup>	77,5±6,7
Vigor (1-5)*	3,7±0,4 <sup>a</sup>	3,3±0,4 <sup>b</sup>	3,1±0,3 <sup>b</sup>	2,9±0,2 <sup>b</sup>	3,1±0,2 <sup>b</sup>	2,7±0,3 <sup>b</sup>	2,7±0,3 <sup>bd</sup>	3,3±0,5
DEFM*	4,0±1,8 <sup>a</sup>	3,3±2,8 <sup>a</sup>	3,8±2,3 <sup>a</sup>	3,9±2,8 <sup>a</sup>	4,9±4,5 <sup>a</sup>	5,0±3,8 <sup>a</sup>	3,5±2,8 <sup>a</sup>	3,8±2,7
DEFMEN	2,2±1,5 <sup>a</sup>	3,3±1,7 <sup>a</sup>	2,6±1,5 <sup>a</sup>	3,1±2,2 <sup>a</sup>	2,9±2,0 <sup>a</sup>	3,3±2,6 <sup>a</sup>	2,9±1,2 <sup>a</sup>	2,9±1,8
DEFT*	6,2±3,1 <sup>a</sup>	6,6±3,2 <sup>a</sup>	6,4±2,3 <sup>a</sup>	7,0±4,3 <sup>a</sup>	7,8±6,0 <sup>a</sup>	8,3±6,3 <sup>a</sup>	6,4±3,4 <sup>a</sup>	6,6±3,7
Supravital (%)*	92,5±4,4 <sup>a</sup>	85,9±13,7 <sup>bc</sup>	82,6±6,2 <sup>b</sup>	80,0±6,6 <sup>b</sup>	74,4±5,1 <sup>bd</sup>	80,0±4,3 <sup>b</sup>	76,4±2,9 <sup>bd</sup>	84,9±10,4
Hiposmótico(%)*	87,2±7,0 <sup>a</sup>	76,9±7,2 <sup>bc</sup>	66,8±9,4 <sup>b</sup>	62,9±2,8 <sup>bd</sup>	58,1±6,4 <sup>bd</sup>	53,1±2,4 <sup>bd</sup>	47,7±4,2 <sup>bd</sup>	72,8±13,5
Total de fetos**	14,9±3,8 <sup>a</sup>	13,0±3,3 <sup>b</sup>	14,6±3,1 <sup>ab</sup>	12,5±2,9 <sup>b</sup>	13,6±1,9 <sup>ab</sup>	12,6±2,9 <sup>b</sup>	14,2±2,1 <sup>ab</sup>	13,7±3,3

<sup>ab</sup>Médias de valores na mesma linha, seguidas de letras minúsculas diferem entre si pelo teste de Tukey e\*\* teste de Duncan ( $p < 0,05$ ); \*

<sup>ab</sup>Médias de valores na mesma linha, seguidas de letras maiúsculas diferem entre si pelo teste de Kruskal Wallis ( $p < 0,05$ ); Média $\pm$ dp( ) = Média, desvio padrão e número de observações; DEFM: % de defeitos maiores; DEFMEN: % de defeitos menores; DEFT: % de defeitos totais.

Observa-se que apesar dos valores registrados nos testes que avaliam a viabilidade dos espermatozoides diminuírem com o tempo de armazenamento ( $p < 0,05$ ), o mesmo não acontece com o número total de fetos nascidos, que não apresentou diferença quando as fêmeas foram inseminadas com doses correspondentes a hora zero (0), ou inseminadas com doses armazenadas por 72 horas após a coleta do sêmen. Os menores valores observados para o número total de fetos das doses armazenadas por 12, 36 e 60 horas podem ser atribuídos ao maior número de fêmeas inseminadas com os machos 1 e 2 da linhagem A que, como mostrado na tabela 1 apresentaram-se menos férteis. Com isso, é possível afirmar que a utilização de doses armazenadas por 72 horas, desde que se encontre com valores mínimos aceitáveis de motilidade espermática (50%), não interfere na taxa de parição quando estas são processadas a partir de coletas de sêmen de machos comprovadamente férteis.

Pérez-Llano (2001), avaliando o sêmen estocado por 9 dias a 15°C não encontrou diferença ( $p > 0,01$ ) quanto à motilidade até as 48 horas de armazenamento. Contudo, no presente estudo, foi observado que logo após a diluição e preparação das doses de sêmen (tempo 0), o valor para motilidade diferiu ( $p < 0,05$ ) entre os demais tempos de armazenamento (tabela 2). O referido autor também avaliou a porcentagem de espermatozoides viáveis pelo teste hiposmótico e encontrou diferença significativa ( $p < 0,01$ ) do momento da estocagem (81,5 $\pm$ 1,2%) até o período de 24 horas de armazenamento (50,8 $\pm$ 2,2%) onde foi realizada a primeira avaliação após o período de resfriamento. No entanto, no presente estudo, já nas primeiras 12 horas de estocagem do sêmen, foi observada uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) do número de espermatozoides viáveis pelo teste hiposmótico quando comparada com a porcentagem de espermatozoides viáveis logo após a diluição.

Embora o BTS seja considerado um diluente de curta duração, Reis et al. (2000) observaram que, para alguns machos, a motilidade esteve próxima de 60% até 168h de armazenamento. Da mesma forma, ao avaliar ejaculados oriundos de oito machos, diluídos em BTS e mantidos a 15°C, Ohata (2001) também constatou valores de motilidade superiores a 60%, para alguns machos, após 96h de armazenamento. Conforme preconizado pelo CBRA (1998), de uma maneira geral, todas as doses mantiveram uma motilidade aceitável, superior a 50% durante as 72 horas de armazenamento e, assim não causaram grandes variações no número total de fetos nascidos.

Em relação aos testes complementares, houve um maior decréscimo na porcentagem de espermatozoides viáveis pelo teste hiposmótico quando comparado com o teste supravital (tabela 2). Portanto, essa diferença provavelmente não interferiu na taxa de parição. A integridade da membrana plasmática vem sendo estudada por diferentes técnicas, e a combinação delas tem ajudado a explicar as variações observadas. Tartaglione e Ritta (2004) avaliando sêmen de touros, explicaram a variação na taxa de fecundação quando combinaram os resultados do teste hiposmótico com os da eosina-nigrosina, tendo sido encontrados 69,8% de espermatozoides vivos na avaliação com o corante supravital e 58,8% de células reativas ao teste hiposmótico. Combinando-se os dois testes, foi possível reduzir o número de falsos positivos e aumentar a habilidade para detectar diferenças nas propriedades da membrana plasmática, obtendo-se 51,2% de espermatozoides vivos e reativos (funcionais). Os valores encontrados nos testes complementares que avaliam a viabilidade da membrana plasmática dos espermatozoides logo após a diluição (tempo 0h), foi superior aos encontrados nas doses que foram resfriadas. A integridade física da membrana plasmática avaliada pelo teste supravital caiu de 92,5% para 85,9%, e a atividade bioquímica da membrana plasmática avaliada pelo teste hiposmótico caiu de 87,2% para 76,9% após 12 horas de estocagem e, após 72 horas de resfriamento estes valores caíram para 76,4% e 47,7% nos testes supravital e hiposmótico respectivamente.

No que diz respeito ao vigor espermático, segundo CBRA (1998), somente o sêmen apresentando um vigor mínimo de 2,5 é capaz de manter sua capacidade fecundante. Nesse sentido, observa-se que em todos os tratamentos, esse valor foi mantido por até 72 horas de estocagem.

A suinocultura moderna busca aumentar constantemente a produtividade, sendo que o número de leitões nascidos vivos e totais são dois importantes parâmetros para a avaliação da eficiência reprodutiva em matrizes suínas. Os aspectos ligados à reprodução como fertilidade e a prolificidade são elementos importantes, pois interferem diretamente na exploração suinícola, sendo primordiais dentro do processo produtivo (Ribeiro, et al., 2008).

De acordo com os resultados apresentados pela tabela 10, fêmeas de ordem de parto de 2 a 5 são as que obtiveram um maior número de leitões nascidos vivos. Já as porcas de ordem de parto 1 e 2 foram as que apresentaram um menor número de leitões nascidos mortos, assim como as fêmeas da classe 3, que não se diferenciaram estatisticamente daquelas, para a referida característica. O número total de fetos nascidos, assim como o número de fetos nascidos mumificados não diferenciaram ( $p>0,05$ ) segundo a ordem de parto.

Tabela 10: Média e desvio padrão das características do nascimento dos leitões de acordo com a classe de ordem de parto das fêmeas inseminadas.

<i>Características</i>	<i>Classe</i>					<i>Total</i>
	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	
NLNV	10,6±2,6 <sup>a</sup>	12,4±3,1 <sup>b</sup>	12,7±2,6 <sup>b</sup>	10,8±2,9 <sup>a</sup>	10,5±2,9 <sup>a</sup>	11,5±3,1
NLNM	0,9±1,3 <sup>a</sup>	0,8±1,1 <sup>a</sup>	1,3±1,4 <sup>ac</sup>	2,2±2,7 <sup>bc</sup>	3,3±3,2 <sup>b</sup>	1,7±2,3
Mumificados	0,4±0,6 <sup>a</sup>	0,4±0,7 <sup>a</sup>	0,6±0,7 <sup>a</sup>	0,7±1,1 <sup>a</sup>	0,6±1,0 <sup>a</sup>	0,5±0,9
Total de fetos	12,0±2,5 <sup>a</sup>	14,5±2,6 <sup>a</sup>	14,5±2,6 <sup>a</sup>	13,7±3,9 <sup>a</sup>	14,4±3,4 <sup>a</sup>	13,7±3,3

<sup>a,b</sup>Médias de valores na mesma linha, seguidas de letras minúsculas diferem entre si pelo teste de Kruskal Wallis ( $p < 0,05$ ); Média±dp( ) = Média, desvio padrão e número de observações; NLNV: Número de leitões nascidos vivos; NLNM: Número de leitões natimortos; Classe 1: marrã; Classe 2: segundo parto; Classe 3: terceiro ao quinto partos; Classe 4: sexto ao oitavo partos; Classe 5: nono ao décimo primeiro partos.

Apesar de o número total de leitões nascidos não ter diferido em relação às ordens de parto, o número de leitões nascidos vivos diferiu. Isto pode ser devido ao fato de marrãs possuírem uma menor habilidade materna. No entanto, já no segundo parto, onde de acordo com Schenkel et al., (2005) ocorre a “síndrome do segundo parto” houve um aumento no número de leitões nascidos vivos. Estes resultados contrastam com os encontrados por Schenkel et al., (2007) que encontraram um maior número de leitões nascidos vivos no primeiro parto em relação ao segundo.

Alkmin (2010) avaliou o efeito de protocolos de resfriamento do sêmen sobre a fertilidade de porcas de terceiro ou quarto parto, inseminadas com doses armazenadas durante um período de 12 a 72 horas e encontrou uma média de 15,0 de leitões nascidos totais; 14,3 de leitões nascidos vivos; 0,7 de leitões natimortos e 0,7 de leitões mumificados. De acordo com o presente estudo, as porcas da classe 3, onde estavam inseridas as fêmeas de terceiro, quarto e quinto parto, apresentaram valores semelhantes aos encontrados por Alkmin (2010) no que diz respeito ao número total de fetos nascidos (14,5) e ao número de fetos mumificados (0,6). Porém os valores referentes ao número de leitões nascidos vivos (12,7) e número de leitões natimortos (1,3), apresentaram-se piores aos de Alkmin (2010)

Ribeiro et al., (2008) estudando o efeito da taxa de parto sobre a fertilidade em suínos, não encontrou diferença ( $p > 0,05$ ) no número de leitões nascidos vivos nas porcas de 1º, 2º, 3º, 4º e 6º partos e nem entre porcas de 1º, 2º, 3º, 4º e 7º partos. Também não encontrou diferença entre as porcas de 3º, 4º, 5º e 6º partos. Entretanto, observou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para o número de leitões nascidos vivos entre porcas de 5º em comparação com as de 1º, 2º e 7º partos. Para o número de leitões nascidos totais, as médias encontradas mostraram que não encontrou diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) nas porcas de 1º parto quando comparadas com

as de 2º, 3º e 7º partos. O mesmo aconteceu entre as porcas de 3º parto em relação às porcas de 4º, 5º e 7º partos e entre as porcas de 4º comparadas com as de 5º, 6º e 7º partos. Contudo, encontrou uma diferença significativa ( $P < 0,05$ ) para o número de leitões nascidos totais entre as porcas de 1º e 2º partos em relação às de 4º, 5º e 6º partos. No entanto, Moretti et al. (2005) encontraram um maior número de leitões nascidos vivos no 7º parto. No presente estudo, foi encontrado um maior número de leitões nascidos vivos em porcas de segundo ao quinto parto (classe 1 e 2), a partir do sexto parto (classe 3) houve um decréscimo no número de leitões nascidos vivos, podendo ser devido a possíveis distocias que são comuns em porcas com ordem de parto maiores. Segundo Pejask (1984), fêmeas mais velhas possuem tônus muscular menor e partos mais prolongados.

Privado Filho e Toniollo (2011) encontraram que, em relação ao tamanho da leitegada a ordem de parto 1 apresentou o número médio de leitões nascidos totais/leitegada superior a ordem de parto 2, assim como o número de leitões nascidos vivos/leitegada também se mostrou superior ao da ordem de parto 2. Fato este diferente do encontrado por Martins et al (2005), que relataram que as primíparas apresentaram menor número de leitões totais nascidos e nascidos vivos em relação as outras ordens de parto. Mas está de acordo com Schenkel et al (2007) que afirmam haver a redução de leitões no segundo parto em relação ao primeiro em diversas granjas.

Na ordem de parto 2 a média dos valores apresentados na Tabela 10 foi de 12,4 de leitões nascidos vivos. Os números foram superiores aos encontrados por Privado Filho e Toniollo (2011) que observaram uma variação de 8,8 a 11,3 de leitões nascidos vivos. A média total de leitões nascidos de 14,5 também mostrou-se superior à média encontrada por Privado Filho e Toniollo de 10,0 leitões/leitegada. Essas diferenças podem ser devido ao fato do experimento de Privado Filho e Toniollo (2011) ter sido realizado no sudeste goiano, região conhecidamente quente, o que eleva o nível de estresse das matrizes e, desta forma interferindo nas taxas de fertilidade. Segundo Costa et al. (2005), as elevadas temperaturas aumentam a taxa de mortalidade embrionária, principalmente durante o primeiro mês de gestação.

A seguir (tab. 11), são demonstrados os valores de correlação entre todos os parâmetros estudados.

Tabela 11: Correlação entre testes de avaliações espermáticas e fertilidade de suínos

	TFETOS	NLNV	NLN	NLM	MOT	VIG	DEM	DEMEN	DEFT	SV	HIPO
TFETOS	1	0,66	0,46	0,23	0,14	0,17	NS	-0,17	NS	NS	0,15

<b>NLNV</b>	1	-0,31	-0,16	0,18	0,21	NS	-0,16	NS	NS	NS
<b>NLN</b>		1	0,15	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<b>NLM</b>			1	NS	NS	-0,13	NS	-0,14	NS	NS
<b>MOT</b>				1	0,82	NS	-0,18	NS	0,6	0,62
<b>VIG</b>					1	NS	NS	NS	0,6	0,52
<b>DEM</b>						1	0,36	0,9	NS	NS
<b>DEMEN</b>							1	0,74	NS	NS
<b>DEFT</b>								1	NS	NS
<b>SV</b>									1	0,43
<b>HIPO</b>										1

TFETOS: número total de leitões nascidos por leitegada; NLNV: número de leitões nascidos vivos; NLN: número de leitões natimortos; NLM: número de leitões mumificados; MOT: motilidade; VIG: vigor; DEM: defeitos maiores; DEMEN: defeitos menores; DEFT: defeitos totais; SV: teste supravital; HIPO: teste hiposmótico.

Foi observada uma correlação significativa entre o número total de fetos nascidos e o número de leitões nascidos vivos ( $r=0,66$ ). Resultado este já previsto, uma vez que com o aumento do número total de leitões nascidos por leitegada é esperado também um número maior de leitões nascidos vivos. Assim como é esperado também, com o aumento do número de fetos nascidos, um acréscimo no número de leitões natimortos ( $r=0,46$ ) e no número de mumificados ( $r=0,23$ ).

Espera-se que com doses de sêmen contendo altas taxas de espermatozoides móveis e com alta força de deslocamento haja um maior número de leitões nascidos totais além de um maior índice de leitões nascidos vivos por leitegada, fato observado no presente estudo, onde ocorreu uma correlação significativa entre a motilidade e o número total de fetos nascidos ( $r=0,14$ ), e o número de leitões nascidos vivos ( $r=0,18$ ). Neste sentido, Gadea et al., (1998), observou uma correlação positiva ( $p<0,01$ ) entre tamanho da leitegada e motilidade do sêmen fresco ( $r=0,34$ ) e entre tamanho da leitegada e teste hiposmótico ( $r=0,35$ ). Da mesma forma, Pérez-Llano (2001) também encontrou correlação positiva ( $p<0,01$ ) entre motilidade e número total de fetos nascidos ( $r=0,05$ ). Houve também uma correlação positiva ( $p<0,01$ ) entre o número total de fetos nascidos com o teste hiposmótico ( $r=0,04$ ). Ruiz-Sánchez et al. (2006) verificaram correlação significativa entre a motilidade seminal aos 7 e 10 dias de armazenamento e os resultados de fertilidade de 12 machos avaliados. É previsto que haja uma correlação significativa entre os testes que avaliam a viabilidade da membrana plasmática e o número total de fetos nascidos, porém foi observada apenas uma correlação entre o teste hiposmótico e o número total de fetos nascidos ( $r=0,15$ ). O teste supravital não obteve correlação significativa com o número total de fetos nascidos ( $p>0,05$ ). Em relação às anormalidades espermáticas apenas os defeitos menores obtiveram correlação significativa com o número total de fetos ( $r=-0,17$ ). Os demais índices que avaliam as anormalidades



espermáticas (defeitos maiores e defeitos totais) não obtiveram correlações com o número total de fetos nascidos ( $p > 0,05$ ).

Foi observada também uma correlação significativa entre motilidade e o teste supravital ( $r=0,6$ ) e entre motilidade e o teste hiposmótico, o que de certa forma era esperado, devido ao fato de que doses inseminantes contendo espermatozoides com membrana plasmática íntegra e bioquimicamente ativa, apresentam também células com alta motilidade. O teste hiposmótico obteve uma correlação significativa com o teste supravital ( $r=0,43$ ), o que já era esperado uma vez que ambos os testes avaliam a viabilidade das células espermáticas. Correa e Zavos (1994) em experimento com touros, obtiveram, para a solução de 100 mOsm/L, o número máximo de caudas enroladas ( $48,0 \pm 4,7\%$ ), e os resultados do corante supravital indicaram uma média de  $56,6 \pm 5,4\%$  de células com membrana íntegra. Estes autores observaram também alta correlação entre as porcentagens de células com membrana intacta e de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico ( $r = 0,81$ ;  $P < 0,05$ ).

- ALKIMIN, D.V., Efeito da fração do ejaculado e do método de conservação sobre as características físicas do sêmen suíno e a fertilidade da fêmea. **Dissertação (Mestrado)**. UFMG: Escola de Veterinária. 228f., 2010.
- ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C. de C.; ALONSO, M.A., et al: Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros, **Reprod Dom Anim**, Belo Horizonte, v.35, n.2, p.145-151, abr./jun. 2011.
- BERNARDI, M.L., Tecnologias aplicadas no exame do ejaculado suíno para a produção de doses de sêmen de alta qualidade. **Acta Sci Vet**, v.36, p.5-16, 2008.
- BLOM, E., Ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nord Vet Med**, v.25, p.383-391, 1973.
- BRITO, L.; BARTH, A.D.; BILODEAU – GOESSELS, S., et al: Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. **Theriogenology**, v.60, p.1539-1551, 2003.
- CBRA - COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL**: Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal 2aed. Belo Horizonte, 49 p, 1998.
- CORREA, J.R. ; ZAVOS, P.M., The hypoosmotic swelling test : it's employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen - thawed bovine sperm membrane . **Theriogenology**, v. 42, p . 351 - 360 , 1994.
- COSTA, E.P.; COSTA, A.H.A.; CARVALHO, F.F.; et al: Influencia do período quente do ano no tamanho da leitegada de matrizes suínas de granjas do estado de Minas Gerais. Congresso brasileiro de veterinários especialistas em suínos **In:.** Fortaleza. Resumos... Fortaleza: ABRAVES, 2005.
- FERREIRA, F. M.et al. Comportamento de monta e características seminais de suínos jovens landrace e large white. **Cienc. Rural**, Santa Maria-RS. v. 35, n. 1, pp. 131-137, 2005.
- 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., CAMERON, A.,et al:., Application of advanced AI technologies to improve the competitiveness of the pork industry. **In: Proceedings of the 21 IPVS CONGRESS**, Vancouver, Canada. p. 25-29. 2010.
- GADEA J., MATAS C. & LUCAS X., Prediction of porcine semen fertility by homologous in vitro penetration hIVP/assay. **Ani Reprod Sci**. v.56, 95-108. 1998.
- GAGGINI T. S.; MURGAS L. D. S.; ZANGERONIMO M. G., Seleção de Reprodutores Suínos, **Boletim Técnico número 81**, Universidade Federal de Lavras – UFLA, Departamento de Medicina Veterinária p.1-14, 2008.

- HANCOCH, J.L., The morphology of boar spermatozoa, **J. Roy. Microsc. Sco.** V.76, p.84-97, 1957.
- HANCOCK J.L.; HOVELL, G.Jr., The collection of boar semen. **The Veterinary Record** v.71, p.664-665, 1959..
- MARTINS, T. D. D.; COSTA, A. N.; SILVA, J. H. V.; et al:Efeitos da ordem de parto sobre as características das leitegadas ao parto provenientes de matrizes mantidas em ambiente quente. **In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUINOS.** 12, 2005, Fortaleza. Resumos... Fortaleza: ABRAVES, 2005.
- MELO, M.I.V.; HENRY, M., Teste hiposmótico na avaliação de sêmen eqüino. **Arq Bras de Vet e Zoo**, v.51, n.1, p.71-78, 1999.
- MORETTI, A.S.; FALLEIROS, F.T.; ABRAHÃO, A.A.F.; et al:Qualificação da produção de suínos. **Rev Pork World**, ano 5 , n. 28, p. 38-42, 2005.
- OHATA, P.M. A influência do período de equilíbrio, do plasma seminal e da sensibilidade dos machos ao resfriamento na congelabilidade do sêmen suíno. **Dissertação (Mestrado).** Faculdade de Veterinária da UFRGS, Porto Alegre, Brasil, 81f. 2001.
- PEJASK, Z. Some pharmacological methods to reduce intrapartum death of piglets. *Pig news and information*, v.5, p.35-37, 1984.
- 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.
- PINTADO, B.; FUENTE, J.; ROLDAN, E.R.S., Permeability of boar and bull spermatozoa to the nucleic acid stains propidium iodide or Hoechst 33258, or to eosin: accuracy in the assessment of cell viability. **J of Rep and Fert**, v.118, p.145-152, 2000.
- PRIVADO FILHO, J.R.; TONIOLLO, G.H., Aspectos reprodutivos de fêmeas suínas primíparas e secundíparas em Rio Verde - Goiás. **ARS Veterinaria, Jaboticabal, SP**, v.27, n.1, 107-116, 2011.
- REIS, G.R.; OHATA, P.M.; SCHWARZ, P.; et al: Identificação de cachacos com diferentes períodos de viabilidade in vitro. **In: Simpósio Internacional Minitub “Inseminação Artificial em Suínos”.** Flores da Cunha-RS. Anais... Flores da Cunha, p.42-49. 2000.
- REVELL, S.G; MRODE, R.A., An osmotic resistance test for bovine semen. **Anim Reprod Sci**, v.36, p.77-86. 1994.
- RIBEIRO, J.C.; CARVALHO, E.C.; NEPOMUCENO, R.C., Efeito da ordem de parto sobre o número de leitões nascidos vivos e totais em fêmeas suínas, **ZOOTEC**, João Pessoa, PB - Universidade Federal da Paraíba - UFPB, 2008.

- RUIZ-SANCHEZ, A.L.; O'DONOGHUE, R.; NOVAK, S., et al: The predictive value of routine semen evaluation and IVF technology for determining relative boar fertility. *Theriogenology*, v.66 p.736-748. 2006.
- SCHENKEL, A.C.; KUMMER, R.; SCHIMIDT, Caracterização dasíndrome do segundo parto em suínos. **In:** XII Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos Anais. Fortaleza, CE, p.252-253. 2005.
- SCHENKEL, A. C.; BERNARDI, M. L.; BORTOLOZZO, F. P., et al:Quais as principais características das fêmeas que manifestam a síndrome do segundo parto?. **Acta Sci Vet.** 35(Supl.): S63-S72, 2007.
- SWANSON, E. W.; BEARDEN, H. J., An eosin/nigrosin stain for differentiating live and dead spermatozoa. **J Anim Sci**, v.10, p.981-987, 1951.
- TARTAGLIONE, C.M.; RITTA, M.N., Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v.62, p.1245-1252, 2004.