



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINARIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIA**

**“Inseminação artificial pós-cervical em tempo fixo em
porcas recebendo pLH no início do estro”**

DIOGO LUIZ FONTANA

PORTO ALEGRE

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINARIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIA

**“Inseminação artificial pós-cervical em tempo fixo em
porcas recebendo pLH no início do estro”**

Autor: Diogo Luiz Fontana

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do grau de mestre em Ciências
Veterinárias na área de Reprodução Animal

PORTO ALEGRE

2013

CIP - Catalogação na Publicação

Fontana, Diogo Luiz

Inseminação artificial pós-cervical em tempo fixo em porcas recebendo pLH no início do estro / Diogo Luiz Fontana. -- 2013.
61 f.

Orientador: Ivo Wentz.

Coorientador: Fernando Bortolozzo.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. inseminação artificial em tempo fixo . 2. hormônio luteinizante suíno. 3. ovulação. 4. inseminação artificial pós-cervical . I. Wentz, Ivo, orient. II. Bortolozzo, Fernando, coorient. III. Título.

“Inseminação artificial pós-cervical em tempo fixo em porcas recebendo pLH no início do estro”

Aprovado em 28 de Fevereiro de 2013.

APROVADO POR:

Prof. Dr. Ivo Wentz

Orientador

Ana Paula Mellagi

Membro da banca avaliadora

Paulo Eduardo Bennemann

Membro da banca avaliadora

Thomas Luccia Junior

Membro da banca avaliadora

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo gostaria de agradecer à Deus, primeiramente por me proporcionar uma Família especial que sempre esteve do meu lado, sem qualquer contestação, me apoiando em minhas decisões, e depois por me dar saúde, força, coragem e dedicação para concluir o mestrado.

Aos meus Pais pela criação, educação, confiança e apoio pela minha formação pessoal e profissional. Aos meus Irmãos Cassiano, Hamanda e Bianca, por estarem sempre comigo em todos os momentos. Ao Henzo, sempre pensei em você e criei força para continuar.

Aos Professores Ivo, Fernando, Mari e David, pelos conhecimentos e orientação dedicada ao longo de todas as fases desses dois anos.

Aos Amigos e Colegas do Setor de Suínos, pós graduandos, graduandos ou estagiários, todos vocês foram importante, mas principalmente a galera de Papanduvá's Rocks: Rafael Ulguim, Pedro Sbardella, Felipe Betiolo, Luiza Pommerehn, Carine Vier, Julia Moroni e Maria Clara Almeida, sem vocês a execução do projeto seria muito mais difícil. Em particular à Thais e ao João, duas "bixonas" parceiras de vários momentos. Lisiane Souza e Danilo Leal, incentivadores da minha decisão. Aos Amigos que não fazem parte do Setor de Suínos, mas sempre estiveram do meu lado nessa e em outras caminhadas.

À empresa Master Genética Animal, por nos acolher e abrir as portas para a realização do projeto, especialmente aos Méd. Veterinários Rafael Kummer e Paulo Bennemann, e toda equipe da Granja Master V (Carijos). Aos funcionários da UFRGS que de uma forma ou outra colaboraram com minha formação.

À empresa Agrocere PIC e à CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

“Inseminação artificial pós-cervical em tempo fixo em porcas recebendo pLH no início do estro”

Autor: Diogo Luiz Fontana

Orientador: Prof. Dr. Ivo Wentz

Co-Orientador: Prof. Dr. Fernando Pandolfo Bortolozzo

Inseminação artificial em tempo fixo (IATF) associada à inseminação artificial pós-cervical (IAPC) permite uma maior utilização de machos geneticamente superiores e uma redução expressiva de mão de obra na produção de suínos. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficiência da IATF de acordo com diferentes protocolos de (IA), usando pLH - hormônio luteinizante suíno - como indutor da ovulação. Um total de 597 matrizes desmamadas com detecção de estro realizada uma vez ao dia (08:00) foram alocados em três tratamentos: Controle (n = 199) - primeira inseminação realizada no início do estro (0 h) e repetida a cada 24 h, durante o estro; IATF1 (n = 199) - fêmeas receberam 5 mg (4 ml) i.m. de pLH no início do estro, e foram inseminadas 24 horas depois, e IATF2 (n = 199) – fêmeas receberam 5 mg de pLH mas foram inseminadas no início do estro (0 h) e 24 horas depois. Foram realizadas IAPC com doses homospermicas ($1,5 \times 10^9$ de espermatozoides totais/50 ml) em todos os tratamentos. O tratamento hormonal não afetou o intervalo do início do estro à ovulação ($P > 0,05$). O número de inseminações foi de 2,9, 1,0 e 2,0 para Controle, FTAI1 e FTAI2 respectivamente. Não houve diferença entre os tratamentos para taxa de parto e leitões nascidos totais ($P > 0,05$). Leitões nascidos totais por dose inseminante foi diferente ($P < 0,0001$) entre os tratamentos (4,5, 12,5 e 6,2 para Controle, FTAI1 e FTAI2 respectivamente). O uso de pLH no início do estro associado à uma única inseminação em tempo fixo IAPC 24 horas após, não comprometeu o desempenho reprodutivo de porcas multíparas.

Palavras chave: inseminação artificial em tempo fixo (IATF), hormônio luteinizante suíno (pLH), ovulação, inseminação artificial pós-cervical (IAPC)

Abstract

“Fixed-time post cervical artificial insemination in sows receiving pLH at estrus onset”

Author: Diogo Luiz Fontana

Advisor: Prof. Dr. Ivo Wentz

Co-Advisor: Prof. Dr. Fernando Pandolfo Bortolozzo

Fixed-time artificial insemination (FTAI) associated to post cervical artificial insemination (PCAI) allows a wider use of high indexed boars and an expressive reduction on labor requirements in swine production. The aim of this study was to evaluate FTAI efficiency according to different AI protocols, using pLH – porcine luteinizing hormone - as ovulation inductor. A total of 597 weaned sows whose estrus detection was performed once daily (08:00 am) were allocated into three treatments: Control (n= 199) – the first insemination was performed at estrus onset (0 h) and repeated every 24 h thereafter, during estrus; FTAI1 (n= 199) - sows received a 5 mg (4 ml) i.m. injection of pLH at estrus onset, and were inseminated 24 h after, and FTAI2 (n= 199) - sows received 5 mg of pLH but were inseminated at estrus onset (0 h) and 24 h after. PCAI with homospermic doses (1.5×10^9 total sperm cells/50 ml) were performed in all treatments. Hormonal treatment did not affect the interval onset of estrus to ovulation ($P>0.05$). The number of inseminations was 2.9, 1.0 and 2.0 for Control, FTAI1 and FTAI2 respectively. Treatments did not affect farrowing rate and total born ($P>0.05$). Total piglets born per insemination dose was different ($P<0.0001$) among treatments (4.5, 12.5 and 6.2 for Control, FTAI1 and FTAI2 respectively). The use of pLH at estrus onset associated to a single fixed-time PCAI 24 h after does not compromise the reproductive performance of multiparous sows.

Keywords: *Fixed-time insemination, porcine luteinizing hormone, ovulation, post cervical insemination*

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS DA DISSERTAÇÃO

TABELA 1. Número de matrizes atendidas por reprodutor de acordo com o protocolo de inseminação aplicado.....	16
TABELA 2. Desempenho reprodutivo da utilização de inseminação artificial intrauterina (IAU) com uso de dose inseminante com número de células espermáticas inferior à 3 bilhões.....	18
TABELA 3. Principais fármacos empregados na indução da ovulação em suínos.....	22
TABELA 4. Média±desvio padrão e valores máximos e mínimos do intervalo desmame-estro (IDE), duração do estro (DE) e intervalo entre aplicação de pLH e a ovulação(pLHOV).....	24
TABELA 5. Médias, desvios padrão e variação do IDE, TO e LH-OV em fêmeas tratadas (eCG+pLH) e controles (não tratadas hormonalmente).....	25
TABELA 6. Desempenho reprodutivo de multíparas tratadas com pLH, eCG, pLH+eCG, ou não tratadas hormonalmente antes da inseminação artificial (IA) com as respectivas taxas de parto (TP) e nascidos totais (NT) por tratamento.....	26

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO CIENTÍFICO

Table 1. Reproductive performance of sows submitted to different post cervical artificial insemination (PCAI) protocols (means ± standard error of mean).....	49
Table 2. Farrowing rate and number of piglets born according to the insemination being or not performed within the optimal time (between 0 and 24 h before ovulation) and according to the occurrence or not of semen backflow in sows submitted to different post cervical insemination (PCAI) protocols.....	50

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURA DA REVISÃO BIBLIOGRAFICA

FIGURA 1. Variação do momento da ovulação em leitoas com os tratamentos controle, hCG e pLH.....	27
--	----

LISTA DE FIGURA DO ARTIGO CIENTÍFICO

FIGURE 1. Frequency distribution of ovulation time in sows evaluated at 8 h intervals. Control: first post cervical AI (PCAI) performed at estrus onset (0 h) and repeated every 24 h. FTAI1: pLH application at estrus onset and single PCAI at 24 h after pLH application. FTAI2: pLH application at estrus onset and two PCAIs (at estrus onset and 24 h after).....	48
---	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1 Inseminação Artificial na Suinocultura	11
2.2 Situação atual no Brasil e no mundo	12
2.3 Vantagens e limitações no uso da IA	13
2.4 Métodos de IA em Suínos	13
2.4.1 Inseminação Artificial Tradicional	13
2.4.2 Inseminação Artificial Intrauterina	14
2.4.2.1 Vantagens e Limitações da Inseminação Artificial Intrauterina.....	15
2.4.2.2 Desempenho da Inseminação Artificial Intrauterina	17
2.4.3 Inseminação Artificial Intrauterina Profunda	18
2.5 Inseminação Artificial em Tempo Fixo	19
2.5.1 Ciclo Estral.....	19
2.5.2 Ovulação	20
2.5.3 Indução da Ovulação.....	21
2.5.3.1 eCG/hCG.....	22
2.5.3.2 GnRH	23
2.5.3.3 pLH	23
3. ARTIGO CIENTIFICO	29
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA	53

1. INTRODUÇÃO

A adoção de um protocolo de inseminação em tempo fixo (IATF) sem a manipulação do clico estral torna-se difícil, pois não é possível identificar o momento da ovulação, e conseqüentemente realizar a inseminação artificial (IA) no intervalo considerado ideal. Segundo Kemp e Soede (1996), fêmeas que foram cobertas menos de 24 horas antes da ovulação obtiveram, significativamente, maiores taxas de fertilização do que aquelas cobertas depois das 24 horas após a ovulação. Ainda, esses autores salientam que na grande maioria das fêmeas a ovulação ocorre depois de transcorridos 70 a 72% da duração do estro, independentemente, do tempo de duração deste, ou seja, em média a ovulação se dá no início do terço final do estro, porém essa informação retrospectiva não auxilia na definição de um protocolo fixo de IA.

Há grande variabilidade no momento da ovulação após o início do estro em fêmeas suínas. Observa-se que o momento médio de ovulação pode variar de 37 a 45 horas, no entanto a amplitude pode chegar de 8 a 85 horas após o começo do estro. Essa amplitude dificulta a adoção de um protocolo fixo de inseminação, porque existem fêmeas que ovulam mais cedo e outras mais tarde durante o estro, mesmo que a média esteja em torno de 40 a 42 horas após o início do estro (Borchardt Neto et al., 2005).

O emprego de hormônios na para indução e conseqüente sincronização da ovulação em matrizes suínas, com o objetivo de dirigir uma IA para um momento pré-determinado, caracteriza-se em uma atividade facilitadora do manejo reprodutivo. Os benefícios de seu uso associam-se ao aproveitamento mais rápido da vida reprodutiva da fêmea, além de controlar a idade das fêmeas destinadas à reposição. Como provocam a entrada em estro de forma sincronizada, facilitam, não só as incorporações mais direcionadas, homogêneas e ordenadas das fêmeas, mas também o manejo da inseminação artificial (Wentz et al., 2007).

A deposição pós cervical do sêmen em fêmeas suínas, possibilita o uso de uma dose inseminante (DI) com reduzido número de espermatozoides (1,5 bilhão de espermatozoides), permitindo a obtenção de desempenho reprodutivo semelhante ao observado com a inseminação cervical tradicional com doses de 3 bilhões de espermatozoides (Dallanora et al. 2004).

O objetivo desse trabalho foi avaliar o uso de inseminação artificial pós-cervical em tempo fixo, em fêmeas suínas desmamadas, utilizando pLH (*porcine Luteinizing Hormone*) no início do estro como indutor da ovulação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Inseminação Artificial na Suinocultura

A IA é uma biotécnica reprodutiva usada amplamente em várias espécies domésticas, que consiste na deposição do sêmen, por meios instrumentais, no trato reprodutivo da fêmea, podendo ser considerada como o ponto de partida para o melhoramento genético dos rebanhos. A IA nos suínos é uma técnica simples, sendo que cuidados básicos, como higiene, momento ideal da realização e correta aplicação da DI, são os principais pontos que devem ser controlados para que sua execução não comprometa os resultados reprodutivos.

O principal objetivo da utilização desta biotécnica está relacionado à maximização do uso dos ejaculados em relação à monta natural (MN), sem reduzir a eficiência reprodutiva e produtiva do plantel. De maneira geral, os processos envolvidos nos programas de IA são simples em relação ao processamento do sêmen e no procedimento da técnica. O volume e número de células espermáticas das DI variam em função do método de IA utilizado, que pode ser classificado de acordo com o local de deposição da DI.

A IA teve início com os árabes que utilizavam esse método para melhorar a qualidade de seus cavalos. Em suínos a IA iniciou-se na década de 30 na Rússia e Japão, ocorrendo uma evolução lenta e gradativa do uso desta biotécnica em diferentes países, principalmente na Europa (Wentz e Bortolozzo, 1998), mas sua utilização tomou uma proporção maior a partir dos anos 70 e 80, vindo a consolidar seu uso nos anos 90. Desde aquela época buscava-se a relação ideal entre número de células espermáticas, volume da DI e protocolo de realização da IA para que bons resultados zootécnicos fossem atingidos.

Segundo Fazano (1978), no Brasil as primeiras tentativas de IA em suínos foram realizadas com sêmen *in natura* em 1947 por Junqueira e Braun, obtendo 60% de taxa de prenhez, mas podemos considerar que a IA no Brasil começou efetivamente com a instalação de duas centrais de inseminação artificial (CIAs) em Concórdia-SC e Estrela-RS em 1975, após um convênio entre o Ministério da Agricultura, associações de criadores e governos estaduais e municipais. A partir dessas duas CIAs, localizadas estrategicamente na região Sul do país, região de maior produção de suínos, ocorreu a difusão dessa técnica para as unidades produtoras de suínos (Bortolozzo e Wentz, 1997).

A aquisição de DI pela granja pode ser feita através da aquisição de uma CIA externa (programa aberto), ou possuir uma CIA própria (programa fechado). Nos programas abertos a CIA produz e comercializa as DI para diversos produtores. Nesse programa o produtor possui a vantagem de fazer o pedido de DI conforme a demanda dos grupos de cobertura do plantel. A logística de pedido e transporte das DI nesse tipo de programa deve ser bem eficiente entre produtor e CIA, e o risco sanitário de disseminação de doenças é alto. Por outro lado, nos programas fechados a CIA pode ser instalada na própria granja, não havendo a necessidade de pedido e transporte das DI até a granja. Isso diminui o risco de entrada de doenças na granja, porém há a necessidade de manter um plantel de machos reprodutores, um laboratório específico e mão de obra técnica e especializada para produção das DI.

2.2 Situação atual no Brasil e no mundo

A maioria dos países da União Europeia adota a IA em 60–80% de suas matrizes (Weitze, 2000). Dados atualizados afirmam que alguns países europeus como Dinamarca, Holanda, Espanha e França, utilizam IA em praticamente 100% do rebanho (Riesenbeck, 2011).

No Brasil, até o início dos anos 90, apenas 2% das matrizes eram cobertas pelo método de IA (Scheid, 1991), sendo que no ano 2000, 27% do rebanho nacional utilizava essa biotécnica, o que correspondia a 51% das coberturas realizadas em granjas tecnificadas (Wentz et al., 2000). Este percentual aumentou significativamente, estimando-se que mais de 90% do plantel tecnificado seja atendido por programas de IA. No entanto, não existem dados estatísticos oficiais que mostrem esta realidade (Bortolozzo et al., 2005b). Riesenbeck (2011) destaca o grande aumento do uso dessa tecnologia em diversos países na última década, destacando o crescimento de 450% no Brasil, onde atualmente 66% do rebanho total utiliza esse manejo para as coberturas. Porcentagens maiores são observadas nos EUA, Canadá, México e Chile, que conta com a participação em torno de 90% dessa tecnologia na produção. Por outro lado a China, país com maior produção de suínos, e outros países asiáticos e africanos, apresentam ainda baixo índice de uso da IA em seus rebanhos.

Mesmo com a consolidação deste manejo na rotina de granjas de suínos, a realização de pesquisas que permitam otimizar o processo em relação ao número de células espermáticas/fêmea coberta, são importantes para o desenvolvimento e aprimoramento da tecnologia.

2.3 Vantagens e limitações no uso da IA

Enquanto para o uso de MN são necessários 4-5% de machos em relação ao plantel de matrizes (1 macho para cada 20-25 fêmeas), uma redução para 0,5-1% (1 macho para cada 100-200 fêmeas) é possível com a adoção da biotécnica de IA. A redução do número de reprodutores no plantel garante uma diminuição no custo de cobertura da matriz suína resultante da redução na aquisição e manutenção de machos no plantel, além da possibilidade de aquisição de machos geneticamente superiores, que agregam características desejadas de carcaças, padronizando os animais produzidos para o abate e diminuindo a variabilidade entre os terminados (Bortolozzo e Wentz, 2005). São indiscutíveis as vantagens que a adoção do uso da IA pode proporcionar, principalmente no que se refere a ganhos genéticos, como maior rendimento de carcaça, melhoria na conversão alimentar e maior ganho de peso (Bennemann, 2005).

A redução de custo por fêmea coberta é otimizada quando são alojadas matrizes no lugar dos machos, aumentando o tamanho do plantel e conseqüentemente o número de leitões produzidos. Além dos fatores já citados, a substituição da MN pela IA trouxe ainda como vantagens: maior segurança sanitária e descarte de ejaculados impróprios para uso.

2.4 Métodos de IA em Suínos

A técnica de IA pode ser classificada de acordo com o local de deposição da DI, sendo que a mais utilizada é a IA que realiza deposição intra-cervical dos espermatozoides, conhecida como Inseminação artificial tradicional (IAT). Contudo, visando otimizar o uso desta biotécnica, foram desenvolvidos outros métodos de IA que permitem a deposição intrauterina do sêmen, com o intuito de reduzir o número de células espermáticas na DI. A técnica de inseminação intrauterina pode ser classificada ainda em intrauterina (IAU) ou pós-cervical, quando deposição da DI ocorre no colo do útero, e intrauterina profunda (IAUP), quando a deposição ocorre na porção final do corno uterino, variando em função do número de células a serem utilizadas na DI.

2.4.1 Inseminação Artificial Tradicional

A técnica tradicional de IA visa fixar a pipeta na cervix e fazer a deposição intracervical profunda da DI (Bortolozzo et al., 2005). Esse método preconiza o uso de uma DI de 3-4 bilhões de células espermáticas em 100 ml de volume (Watson e Behan, 2002). Normalmente são realizadas de duas a três inseminações durante o estro, o que

resulta em um total de até 9 a 12 bilhões de espermatozoides/fêmea/estro (Martinez et al., 2005; Diehl et al., 2006).

A partir da implantação da IA em suínos, iniciou-se uma busca constante na determinação do volume e número mínimo de células espermáticas para alcançar bons índices reprodutivos. Na década de 60, estudos demonstraram a necessidade mínima de 5 bilhões de espermatozoides em doses de 100 ml, para alcançar índices aceitáveis de fecundação (Stratman e Self, 1960; Baker et al., 1968). Estudos mais recentes mostram a possibilidade de utilizar DI com menos células espermáticas na IAT. Ao avaliar inseminações com DI de 95 ml com diferentes números de células (2, 3 e 4 bilhões de espermatozoides), Marchetti et al. (2001) não encontraram diferença na taxa de retorno ao estro e na taxa de parto, porém observaram que as inseminações realizadas com DI de 2 bilhões de espermatozoides tiveram menor número de nascidos totais (0,7 leitões) comparadas as inseminações com DI de 4 bilhões de células espermáticas ($p=0,02$). Nessa mesma linha, Bennemann et al. (2005) realizaram IAT, com uma única DI de 90 ml contendo 1,5 bilhões de espermatozoides, entre 0 e 30 horas antes da ovulação e observaram que a taxa de prenhez não é afetada com esta técnica, utilizando doses de até 48 horas de armazenamento. Porém para que estes resultados fossem alcançados houve um rígido controle de pontos críticos relacionados à qualidade do ejaculado e a IA propriamente dita. Portanto, para garantir a eficiência do processo o protocolo utilizado na rotina da maioria das granjas ainda é composto por doses contendo 3-4 bilhões de espermatozoides em um volume de 80-100 ml.

Uma grande amplitude no volume de refluxo da DI pode ser observada utilizando a técnica de IAT, sendo que Steverinck et al. (1998) observaram refluxo entre 20 e 120%, semelhante a Flores (2001) que encontrou de 0 e 118% de refluxo do total infundido na DI, observando também a presença de secreção do trato genital feminino na constituição do volume total de refluxo. Da mesma forma como o volume, o número de espermatozoides também pode ser observado e medido no refluxo. Segundo Steverinck et al. (1998) perdas superiores a 5% de espermatozoides inseminados no momento da realização da IA influencia negativamente a fecundação em fêmeas inseminadas com doses de 1×10^9 de espermatozoides no método IAT.

2.4.2 Inseminação Artificial Intrauterina

A inseminação artificial intrauterina (IAU) consiste na deposição seminal no lúmen uterino, em torno até de 20 cm após a cérvix, o que possibilita a redução do

número de espermatozoides na DI (Watson e Behan, 2002). Para proporcionar a deposição de espermatozoides próximo ao local da fecundação, diminuindo as perdas por refluxo e fagocitose, e permitindo a utilização de DI com reduzido número de células espermáticas. Segundo Dallanora (2004), inicialmente foram utilizadas técnicas que incluíam a deposição cirúrgica, com o animal sob anestesia, o que inviabiliza a utilização a campo. Atualmente utiliza-se um cateter de menor calibre que desliza pelo interior de uma pipeta tradicional de fixação cervical, podendo transpor a cérvix de 5 a 20 cm e permitindo a deposição da DI no corpo ou cornos uterinos. Esta técnica possibilita o emprego de doses com 1 bilhão de espermatozoides em volumes de 50 a 60 ml, correspondendo a uma redução de 60% no número de espermatozoides na DI e 25-30% no volume de diluente consumido pela central (Watson e Behan, 2002).

2.4.2.1 Vantagens e Limitações da Inseminação Artificial Intrauterina

A redução do número de células espermáticas proporciona um aumento na quantidade de DI produzidas a partir de um mesmo ejaculado, otimizando o uso dos machos dentro da CIA. Esse processo possibilita a aquisição e utilização de machos geneticamente superiores, resultando em um ganho genético para o rebanho. Segundo Bennemann (2005), devido à redução de células espermáticas por DI, a IAU possibilita obter um ganho de até 300% no número de DI produzidas por reprodutor por ejaculado. Reforçando as vantagens do uso do método de IAU, Bortolozzo et al., (2011), apresentam a relação entre o número de matrizes atendidas por reprodutor nas distintas técnicas de inseminação artificial (Tabela 1).

Tabela 1. Número de matrizes atendidas por reprodutor de acordo com o protocolo de inseminação aplicado

	Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 3
	IA tradicional	IATF tradicional	IATF pós-cervical
Produção espermática anual dos reprodutores	4500 x 10 ⁹ espermatozoides (equivalente a 1500 doses de 3x10 ⁹ espermatozoides)		
Doses/fêmea/ano	6	2,5	2,5
Espermatozoides/dose	3 x 10 ⁹	3 x 10 ⁹	1 x 10 ⁹
Espermatozoides/fêmea/ano	18 x 10 ⁹	7,5 x 10 ⁹	2,5 x 10 ⁹
Relação macho:fêmea	1:250	1:600	1:1800
Protocolo 1: IAT, 2,4 doses/estro, 2,5 inseminações/fêmea/ano			
Protocolo 2: IAT em tempo fixo, 1 dose/estro, 2,5 inseminações/fêmea/ano			
Protocolo 3: IAU em tempo fixo, 1 dose/estro, 2,5 inseminações/fêmea/ano			

Fonte: Adaptado de Bortolozzo et al. (2011)

Segundo Hancock (1959) e Levis et al. (2002), a IAU permite a diminuição de perdas de células espermáticas por refluxo vulvar durante e após a realização da IAU. Dallanora (2004) não observou nenhum caso de refluxo no momento da IAU, porém a perda de espermatozoide, até duas horas após a inseminação, não diferiu ($P > 0,05$) entre IAU e IAT. Utilizando doses de 20 ml de volume total, com diferentes concentrações espermáticas ($0,25 \times 10^9$; $0,5 \times 10^9$ e 1×10^9). Mezalira et al. (2005) não observaram refluxo no momento da realização da IAU, e não encontraram diferença ($P > 0,05$) entre os tratamentos no percentual de volume e espermatozoides refluídos até 60 minutos após a IAU.

A possibilidade de passagem do cateter intrauterino é alta em múltiparas, atingindo índices superiores a 90%, podendo chegar até 100% de sucesso de inserção do cateter intrauterino (Bennemann et al., 2005; Mezalira et al., 2005; Miller et al., 2009). No entanto este alto percentual de sucesso não é observado em fêmeas jovens (Pelland et al., 2008), provavelmente devido a dificuldade ou impossibilidade de inserção do cateter intrauterino seja devido a fatores específicos da anatomia da fêmea. Apesar de se obter sucesso na inserção do cateter intrauterino em uma alta porcentagem de fêmeas

(90 – 97%), alguns animais apresentam sangue na extremidade do cateter. Watson e Behan (2002) e Dallanora et al. (2004), observaram 1,8 e 9,5% de fêmeas com esta característica, respectivamente. A presença de sangue no cateter ou no sêmen refluído, em pelo menos uma IAU, comprometeu a taxa de retorno ao estro comparando fêmeas com e sem presença de sangue, respectivamente 13,8% e 2,6% B ($P < 0,01$) (Dallanora et al., 2004).

2.4.2.2 Desempenho da Inseminação Artificial Intrauterina

Estudos realizados no final da década de 50 por Hancock (1959) sugerem que o local de deposição de sêmen tem grande influencia nos resultados de fecundação. Este autor comparou três locais distintos de deposição de sêmen, utilizando DI de 100 ml de sêmen não diluído e uma única inseminação, e observou taxa de prenhez de 57,1%, 50% e 96,3%, para a deposição vaginal, cervical e uterina, respectivamente. Comparando IAT e IAU com o uso de DI com 1, 2 e 3 bilhões de espermatozoides, Watson e Behan (2002) observaram taxa de parto significativamente menor somente no tratamento IAT com 1 bilhão de células espermáticas. Dallanora et al. (2003), comparando IAT com doses de 3×10^9 de espermatozoides em 90 ml de volume e IAU $1,5 \times 10^9$ de espermatozoides em 60 ml de volume, não encontraram diferença entre os tratamentos para as variáveis retorno ao estro, taxa de prenhez, taxa de parto e número de leitões nascidos totais. De forma semelhante, Bennemann et al. (2005) realizaram IAU com doses de 1 e 2 bilhões, no intervalo de 0-24 horas e 25-36 horas antes da ovulação, e não encontraram diferença na taxa de prenhez, número de embriões totais e sobrevivência embrionária. Utilizando o método de IAU com 0,25, 0,5 e 1 bilhão de espermatozoides, Mezalira et al. (2005) obtiveram resultados promissores com 0,5 bilhão de espermatozoides, tais como taxa de prenhez superior a 85% e 14 embriões totais aos 34-41 dias após IAU. Comparando IAT de 3×10^9 e IAU com $1,5 \times 10^9$ e 1×10^9 em múltiparas, Hernández-Caravaca et al. (2012) observaram desempenho na taxa de parto e nascidos totais no grupo IAT ($82,34 \pm 0,38$; $13,65 \pm 3,14$), IAU $1,5 \times 10^9$ ($86,84 \pm 0,33$; $14,13 \pm 3,05$) e IAU 1×10^9 ($84,08 \pm 0,36$; $13,87 \pm 3,34$), sendo o grupo IAU $1,5 \times 10^9$ diferente estatisticamente do grupo IAT, mas o grupo IAU 1×10^9 não foi diferente dos outros tratamentos. Os resultados obtidos por diversos autores permitem concluir que com o uso do método de IAU é possível utilizar DI com números de células espermáticas inferiores a 3 bilhões sem afetar o desempenho reprodutivo (Tabela 2).

Tabela 2. Desempenho reprodutivo da utilização de inseminação artificial intrauterina (IAU) com uso de doses inseminantes com número de células espermáticas inferior a 3 bilhões

Sptz (x10 ⁹)	Vol (mL)	Taxa Prenhez,%	Taxa Parto,%	NT/ET	Autor
1,5	60	-	94,9	11,5	Dallanora et al. 2004
1,0	80	-	86,9	12,1	Watson & Behan, 2002
0,5	20	-	92,7	11,3	Bennemann et al. 2005
1,0	20	84,7	-	13,3	Mezalira et al. 2003
0,5		85,5	-	14,3	
1,0	60	82,1	-	15,9	Bennemann et al. 2004
2,0		96,5	-	14,9	
1,0	25	93,4	90,6	12,4	Diehl et al. 2006
1,0		96,2	95,1	12,7	

Sptz= Espermatozoide; Vol= Volume; NT= Nascidos Totais; ET= Embriões totais

Fonte: Adaptado de Bennemann (2008)

2.4.3 Inseminação Artificial Intrauterina Profunda

A inseminação artificial intrauterina profunda (IAUP) pode ser realizada com o uso de diferentes instrumentos que permitem a deposição de espermatozoides diretamente no terço final dos cornos uterinos, próximo à junção útero-tubárica (Mathias, 2003).

Utilizando o método de IAUP a 5 cm da junção útero-tubárica, com doses inseminantes contendo 10, 50 e 100 milhões de espermatozoides, Krueger e Rath (2000), compararam as fêmeas inseminadas com IAUP com fêmeas inseminadas tradicionalmente com uma única DI de 1 e 3 bilhões de espermatozoides entre 24-32 horas após o início do estro, não sendo encontrada diferença estatística na taxa de prenhez, taxa de parto e tamanho de leitegadas entre os grupos IAUP e tampouco entre os grupos IAUP e IAT. Usando um cateter flexível (1,8 m de comprimento e 4 mm de diâmetro), Martinez et al. (2001) comparam os resultados de 372 múltiparas suínas inseminadas com DI contendo 150, 50, 25 e 10 milhões de espermatozoides em 10 ml de volume, e 147 matrizes suínas inseminadas com doses de 3×10^9 espermatozoides pelo método IAT. As fêmeas inseminadas pelo método IAUP receberam 1250 UI de gonadotrofina coriônica humana (hCG) 24 horas após o desmame e 750 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG) 72 horas após o eCG. As fêmeas do tratamento controle (IAT) não receberam tratamento hormonal. Os autores não encontraram

diferença na taxa de parto entre o tratamento controle e as fêmeas inseminadas com doses de 150 e 50 milhões de espermatozoides, mas houve uma redução significativa ($P < 0,0001$) nas fêmeas inseminadas com doses de 25 e 10 milhões de espermatozoides.

A adoção do método de IAUP traz benefícios relacionados a redução do número de espermatozoides, redução do refluxo da dose inseminante e um menor tempo para o espermatozoide atingir o reservatório espermático, porém o uso da IAU é realizado por ser um procedimento tecnicamente mais simples do que IAUP (Mozo-Martín et al., 2011). Desta forma, segundo Vasquez *et.al.* (2005), esta é uma tecnologia que poderia ser empregada em situações onde se utiliza sêmen com o tempo de vida útil reduzido, como é o caso do sêmen congelado e/ou sêmen sexado.

2.5 Inseminação Artificial em Tempo Fixo

Os estudos com inseminação artificial em tempo fixo (IATF) preconizam a sincronização do ciclo estral através de combinações hormonais que estimulam o desenvolvimento folicular e posteriormente induzem a ovulação para que a IA seja realizada em um período específico de tempo. A IATF em suínos pode ser dividida em protocolos que preconizam a detecção de estro com posterior realização da IA em momento fixo e, outro onde não se realiza detecção de estro e a IA é realizada em um momento pré-definido, totalmente às cegas.

Estudos observaram que a utilização de protocolos farmacológicos para indução da ovulação pode tornar possível a realização de uma única inseminação através de protocolos de IA em tempo fixo (Candini et al., 1999; Krueger et al., 1999).

2.5.1 Ciclo Estral

O suíno doméstico é considerado uma espécie poliestrica anual, isto é, apresenta ciclos estrais durante todo ano. Este dura em média 21 dias (variação 18-24 dias) e apresenta uma fase folicular, com duração de 4 a 5 dias e uma fase luteal, com duração de 15 a 17 dias (Borchardt Neto et al., 2005). A fase folicular é o período que se inicia com a regressão do corpo lúteo e se estende até a ovulação, sendo subdividida em pró-estro e estro. Nesta fase há predominância de folículos em crescimento, produção de estradiol, ocasionando alterações anatômicas e comportamentais na fêmea. A fase luteal é o período entre a ovulação até a regressão do corpo lúteo, sendo subdividida em metaestro e diestro, tendo predomínio da progesterona produzida pelos corpos lúteos

chegando aos níveis máximos entre os dias 12 e 14 do ciclo, decaindo para níveis basais nos dias 17 e 18, dando início a um novo ciclo (Fries, 2010).

O estro é definido pelo período próximo à ovulação onde a fêmea demonstra reflexo de imobilidade na presença de um macho e mantém-se receptiva ao acasalamento (Soede e Kemp, 1997). Segundo Soede et al. (1995), o estro em porcas dura em torno 50 – 60 horas, variando entre 24 e 88 horas, e em alguns casos pode chegar até 96 horas (Weitze, 1994). Marchetti (2001) observou um período de estro médio em porcas de 62 horas, com amplitude de 24 a 112 horas. Já a duração e amplitude da duração de estro em leitoas são menores quando comparado com porcas, sendo a duração do estro em torno de 40 horas (Steverink et al., 1999), ou segundo Uemoto (1999), duração do estro de 50 horas com amplitude de 24 a 72 horas. Estes dados demonstram que pode haver grande variabilidade entre fêmeas de um mesmo rebanho e entre rebanhos (Steverink et al., 1999). A duração média do estro subsequente é parecida no rebanho, mas isso não vale para o indivíduo. Conforme Soede e Kemp (1997), apenas 29% das fêmeas repetem a mesma duração do estro. Estas variações observadas na duração do estro podem ser explicadas parcialmente por alguns fatores, entre eles: genótipo, ordem de parto, estação do ano, duração da lactação, intervalo desmame-estro, manejo utilizado para a detecção do estro e estimulação do macho (Soede e Kemp, 1997).

2.5.2 Ovulação

Ovulação é definida como o momento que ocorre a ruptura dos folículos terciários e liberação dos oócitos. É um fenômeno dinâmico, que ocorre de forma espontânea, caracterizado pela ruptura de um sistema vascular e pela destruição do tecido conectivo da parede do folículo de Graff, com a liberação dos oócitos maduros para a fecundação, desencadeada pelo pico de LH (Hormônio Luteinizante), que promove alterações funcionais e estruturais na parede folicular (Lipner, 1988).

Estudos realizados com IA em múltiparas demonstraram que a população espermática permanece viável, de uma maneira geral, por um período de até 24 horas antes da ovulação (Soede et al., 1995; Nissen et al 1997). Soede e Kemp (1997) afirmam que a taxa de fecundação de suínos é aumentada quando a inseminação é realizada durante o período de 24 horas antes e poucas horas depois da ovulação. Visando alcançar o objetivo de que pelo menos uma dose seja realizada nesse período, repetidas inseminações são feitas durante o estro. Em média a ovulação ocorre

transcorrido 64-72% do estro, ou seja, no início do terço final do estro, tornando-se uma informação retrospectiva (Nissen et al., 1997). O pico de LH é o melhor parâmetro endocrinológico para a determinação do momento da ovulação, sendo que esta ocorre em aproximadamente 40 horas após o pico de LH, 42 ± 5 horas (Helmond et al., 1986) e 44 ± 3 (Soede et al., 1994). Porém o pico de LH pode ocorrer 10 horas antes e 36 horas depois do início do estro (Soede et al., 1994), levando a uma grande variabilidade no intervalo de início do estro e a ovulação, com média de 37 a 45 horas, mas amplitude de 8 a 85 horas.

Essa amplitude dificulta a adoção de um protocolo fixo de inseminação, porque existem fêmeas que ovulam precocemente e outras tardiamente ao longo do estro. Devido a essa dificuldade em definir em que momento a ovulação ocorre espontaneamente, o uso de hormônios indutores da ovulação é uma alternativa utilizada para tentar sincronizar a ovulação das fêmeas e tornar possível a adoção de protocolos de IATF.

2.5.3 Indução da Ovulação

Para a realização de IATF, a ovulação deve ser induzida através do uso de gonadotrofinas que, predominantemente, tenham a mesma atividade do LH, como a gonadotrofina coriônica humana (hCG – *human Chorionic Gonadotropin*) e hormônio luteinizante suíno (pLH – *porcine Luteinizing Hormone*) ou através do uso de liberadores de gonadotrofinas como os análogos do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH – *Gonadotropin-Releasing Hormone*) (Fries, 2010), sendo os produtos mais utilizados descritos na tabela 3.

Tabela 3. Principais fármacos empregados na indução da ovulação em suínos

Referência	Produto Utilizado	Momento da aplicação
Knox et al. (2001)	eCG/hCG	No desmame
Brüssow et al. (2009)	Gonadorelina (análogo GnRH)	80h após eCG
Martinat-Botté et al. (2009)	Buserelina (análogo GnRH)	104h após eCG
Baer & Bilker (2004)	GnRH	96h após desmame
Johnston et al. (2009)	Triptorelina (análogo GnRH)	96h após desmame
Candini et al. (1999)	pLH	56h após eCG
Fries et al. (2010b)	Lecirelina	Na detecção do estro
Zack et al. (2010)	pLH	Na detecção do estro

eCG – gonadotrofina coriônica equina; hCG - gonadotrofina coriônica humana; GnRH – Hormônio liberador de gonadotrofina; pLH – Hormônio luteinizante porcino.

Fonte: Bortolozzo et al. (2011)

2.5.3.1 eCG/hCG

Nos suínos o eCG é usado com função de FSH (Hormônio Folículo Estimulante) e LH via ação direta nos ovários, estimulando o crescimento folicular, ovulação e estro em leitoas, e assim desencadeia um novo ciclo em porcas desmamadas (Mellagi et al., 2006). Segundo Guthrie e Bolt (1990) o hCG tem função semelhante ao LH, e além de induzir a ovulação, ele atua na luteinização das células da granulosa, mantém a vida funcional do corpo lúteo e aumenta a secreção de progesterona das células luteinizadas. O uso dessa combinação (eCG/hCG), que culmina em entrada de cio e posterior ovulação, permite a adoção de protocolos de IATF. A combinação mais comumente usada para indução de estro em suínos é 400 UI de eCG associado de 200 UI de hCG (Paterson, 1982). Segundo Viana (2001), quanto menor o intervalo entre as aplicações de eCG e da droga luteinizante (hCG ou LH), melhor é a sincronização da ovulação, pois a chance de ocorrência do pico endógeno do LH antes da injeção da droga luteinizante diminui. Nos protocolos tradicionais, o intervalo entre as aplicações é de 72 horas, o qual resulta em intervalo médio entre a aplicação da droga luteinizante e a ovulação em aproximadamente 40 horas, com um desvio padrão próximo a 6 horas (Candini et al., 2001).

Ao usar a combinação eCG/hCG, Knox et al. (2001) aplicaram 400 UI de eCG associado à 200 UI de hCG no desmame e encontraram valores de intervalo estro ovulação (IEO) igual a 43,7 horas para o grupo controle e 45,6 horas para o grupo tratado ($P>0,05$). Breen et al. (2006) usaram o mesmo protocolo hormonal no desmame e não encontraram influência ($P>0,10$) do tratamento sobre o IEO entre as fêmeas tratadas (40,5h) e fêmeas do grupo controle (35,4h).

2.5.3.2 GnRH

O GnRH, diferente do hCG, atua na glândula pituitária estimulando a liberação do LH. A concentração máxima de LH ocorre entre 2 a 4 horas e se mantém alta por 6 a 8 horas após a aplicação exógena de GnRH, (Brussow et al., 1990). Conforme Gooneratne et al., (1989), o pico de LH induzido não interfere com o que ocorre de forma natural, agindo em conjunto e prolongando a duração do mesmo. O GnRH pode ser dividido em duas categorias dependendo de sua origem: GnRH natural e os análogos de GnRH (sintéticos). Os sintéticos são chamados de superanálagos, com exceção da gonadorelina que é produzida a partir do GnRH natural (Zapletal e Pavlik, 2008), e segundo esses autores, alguns superanálagos podem ser até 20 vezes mais eficientes do que a gonadorelina, além de possuir uma meia vida maior. Além desse agonista e da gonadorelina, outros agonistas têm sido usados na indução da ovulação: goserelina, busarelina, triptorelina e a deslorelina.

2.5.3.3 pLH

O pLH pode sincronizar a ovulação de fêmeas suínas desmamadas, por meio de um protocolo de sincronização que utiliza 600UI de eCG no dia do desmame e 5mg de pLH 72 após o desmame. Com esse protocolo hormonal Candini et al. (2004a), observaram que o hormônio tem a capacidade de concentrar o momento da ovulação de um grupo de fêmeas em aproximadamente 35 horas após aplicação do pLH, sendo que todas as fêmeas ovulam até 44 horas após a aplicação do pLH, diferindo das fêmeas não tratadas hormonalmente. O intervalo desmame estro (IDE) e a duração do estro (DE) também foram melhores nas fêmeas tratadas hormonalmente (Tabela 4).

Tabela 4. Média± desvio padrão e valores máximos e mínimos do intervalo desmame-estro (IDE), duração do estro (DE) e intervalo entre aplicação de pLH e a ovulação (pLH-OV)

Variáveis	Tratamentos		
	T1	T2	T3
Horas			
IDE	87,4±3 ^b (87-111)	87±0 ^b (87)	99,1±13,6 ^a (63-135)
DE	44,3±8,78 ^b (12-60)	41,3±9,77 ^b (24-60)	60,1±10,22 ^a (36-84)
pLH-OV	35,7±6,07 ^b (24-48)	35,5±6,06 ^b (24-48)	56,1±15,91 ^a (18-112)

Letras sobrescritas diferentes, dentro do mesmo item e mesma linha diferem estatisticamente (P<0,0001)

T1= 600 UI de eCG após desmame e 5 mg de pLH, 72 h após eCG , com única inseminação artificial (IA) 24 h após pLH;

T2= mesmo tratamento hormonal do T1, com 2 IA, 24 e 32 h após pLH;

T3= grupo controle sem tratamento hormonal, com 3 IA.

Fonte: Adaptado de Candini et al. (2004a)

Estudando a efetividade do pLH como indutor da ovulação em fêmeas desmamadas, Candini et al. (2004b) usaram o seguinte protocolo hormonal: 600 UI de eCG 24 horas após o desmame, e 5 mg de pLH 56 horas após o eCG, e comparando com fêmeas não tratadas hormonalmente, observaram que o intervalo desmama-estro (IDE) foi reduzido (P=0,01) nas fêmeas tratadas comparadas ao grupo controle (87,4 vs 98,5 horas, e a taxa de ovulação do tratamento foi semelhante (P=0,2) à do controle (23,16±12,19 vs 20,08±5,19, respectivamente). Para as fêmeas que receberam tratamento hormonal, as ovulações ocorreram entre 32 e 48 h (37,25±3,65) após aplicação de pLH sendo diferente (P<0,0001) do controle (63,67±20,22, variando de 32 a 104 h). Estes resultados evidenciam que o hormônio foi capaz de concentrar o momento da ovulação nas fêmeas submetidas à indução da ovulação (Tabela 5).

Tabela 5. Médias, desvios padrão e variação do IDE, TO e pLH-OV em fêmeas tratadas (eCG+pLH) e controles (não tratadas hormonalmente)

Variáveis	Tratadas	Controles	P
	Média±DP (variação)	Média±DP (variação)	
IDE (h)	87,4±9,4 (74 a 110)	98,5±16 (77 a 137)	0,01
TO (CLs)	23,2±12,2 (2 a 76)	20,1±5,2 (7 a 30)	0,2
pLH-OV	37,3±3,7 (32 a 48)	63,7±20,2 (32 a 112)	<0,0001

IDE= Intervalo desmame-estro; TO= Taxa de Ovulação; pLH-OV= Intervalo entre aplicação de LH e ovulação; DP= Desvio Padrão; CLs= Corpos Lúteos.

Fonte: Adaptado de Candini et al. (2004b)

Com o objetivo de avaliar o IEO e emprego de protocolos fixos de IATF, Cassar et al. (2005) fizeram a associação hormonal de 600 UI de eCG no desmame e 5 mg de pLH 80 horas após o eCG, e observaram que todas as fêmeas ovularam até 44 horas após aplicação de pLH. Os resultados reprodutivos desse trabalho são apresentados na tabela 6. A taxa de parto foi maior e houve uma tendência para uma maior taxa de prenhez do grupo que usou somente pLH. Os grupos tratados com associação de eCG e pLH, foram superiores em taxa de prenhez e partos comparando com as fêmeas do grupo controle. E não foi encontrada diferença estatística no tamanho da leitegada entre os tratamentos. Os tratamentos um a quatro foram inseminadas somente fêmeas com presença de estro, e o tratamento cinco a inseminação foi realizada independentemente da manifestação ou não de estro.

Tabela 6. Desempenho reprodutivo de multíparas tratadas com pLH, eCG, pLH+eCG, ou não tratadas hormonalmente antes da inseminação artificial (IA) com as respectivas taxas de parto (TP) e nascidos totais (NT) por tratamento

Tratamento	N	eCG	pLH	Momento IA	TP (%)	NT
1 Controle	131	---	---	5 dias após desmame*	68,7	11,1±2,6
2 eCG	111	Desmame	---	5 dias pós desmame*	69,0	10,7±3,2
3 pLH	113	---	80h após desmame	36 e 44h após pLH	81,4 ^a	10,3±3,3
4 eCG+pLH	110	Desmame	80h após desmame	36 e 44h após pLH	84,2 ^b	10,3±3,1
5** eCG+pLH	102	Desmame	80h após desmame	36h após pLH	86,1 ^b	10,6±3,5

*Uma IA pela manhã e outra à tarde

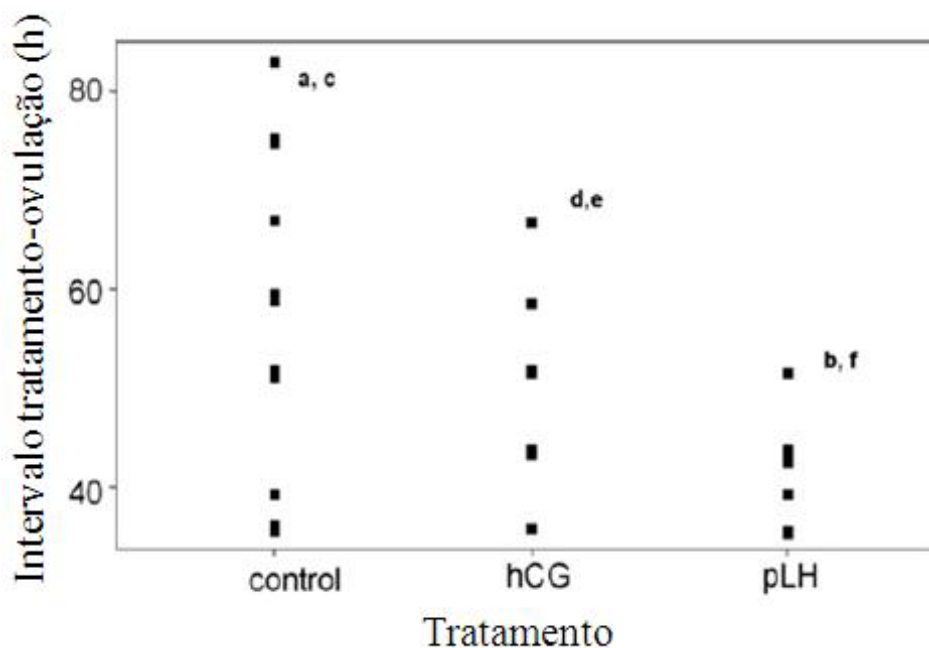
** Somente uma IA independentemente do diagnóstico de estro

^{a,b} na mesma coluna diferem do controle: ^a, P<0,05; ^b, P<0,01

Fonte: Adaptado de Cassar et al. (2005)

Degenstein et al. (2008) sincronizaram o estro de leitoas utilizando por um período de 14 a 18 dias 15mg/dia de Altrenogest, com posterior indução do crescimento folicular com 600 UI de eCG, um dia após o término do tratamento com Altrenogest. Após este processo, as leitoas foram divididas em 3 tratamentos, 80 horas após aplicação de eCG, grupo 1: 5mg de pHL; grupo 2: 750 UI de hCG; e aplicação de solução fisiológica para o grupo 3. Não houve diferença entre a duração do estro nos tratamentos, mas o IEO foi menor nas fêmeas onde foi aplicado pLH (Figura 1). Este trabalho demonstra que, o pLH é eficiente em diminuir a variação encontrada no IEO podendo ser utilizado em protocolos de IATF.

Figura 1. Variação do momento da ovulação em leitoas com os tratamentos controle, hCG e pLH.



^{a,b} Valores sem letras sobrescritas em comum foi diferente ($P=0,001$);

^{c,d} Valores sem letras sobrescritas em comum foi diferente ($P<0,05$);

^{e,f} Valores sem letras sobrescritas em comum tenderam ser diferente ($P=0,06$);

Fonte: Degenstein et al. (2008)

Utilizando 600 UI de eCG no desmame em múltiparas, e aplicando 5 mg de pLH 80 horas após a aplicação de eCG, Abad et al. (2007) observaram intervalo de aplicação de pLH e ovulação de $38,4 \pm 0,3$ horas (média \pm EPM), com todas as fêmeas ovulando entre 35 e 42 horas. Esses autores observaram também que 75,7% das fêmeas ovularam entre 37 e 39 horas após a aplicação de pLH.

Nesta mesma linha, Zak et al. (2010) conduziram um experimento com o objetivo de determinar o desempenho reprodutivo de fêmeas múltiparas após administração de 5 mg de pLH no início do estro utilizando duas IAT comparando com o protocolo padrão de inseminação da granja no qual as fêmeas recebiam, no mínimo, duas inseminações com intervalos de 24 horas até o final do estro, e não encontraram diferença estatística na taxa de prenhez e na taxa de parto ajustada ($P>0,05$) entre os tratamentos. Porém o número de leitões nascidos totais foi melhor ($P<0,01$) nas fêmeas tratadas ($12,88 \pm 0,27$), comparando com as fêmeas controle ($8,11 \pm 0,29$). Em um segundo experimento mais arrojado do que o primeiro, usando o mesmo protocolo hormonal, mas apenas uma

única inseminação, Zak et al. (2011) observaram que a IATF não comprometeu o número de nascidos totais nem a taxa de parição da granja comparado com o grupo controle, $12,23 \pm 0,3$ vs $12,21 \pm 0,3$ e $94,6$ vs 86 , respectivamente.

3. ARTIGO CIENTÍFICO

**Fixed-time post-cervical artificial insemination in sows receiving porcine
luteinising hormone at oestrus onset**

D.L. Fontana¹, R.R. Ulguim¹, P.E. Sbardella¹, M.L. Bernardi², F.P. Bortolozzo¹,
I. Wentz¹

¹ Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Faculdade de
Veterinária, Setor de Suínos, Porto Alegre, RS, Brazil

² UFRGS, Faculdade de Agronomia, Departamento de Zootecnia, Porto Alegre,
RS, Brazil

E-mail: fpbortol@ufrgs.br

Abstract

Fixed-time artificial insemination (FTAI) together with post-cervical artificial insemination (PCAI) allows a wider use of high indexing boars and an expressive reduction in labour requirements in swine production. The aim of this study was to evaluate FTAI efficiency according to different artificial insemination (AI) protocols, using porcine luteinising hormone (pLH) as an ovulation inductor. A total of 597 weaned sows whose oestrus detection was performed once daily (08:00 am) were allocated into three treatment groups: Control (n= 199) - the first AI was performed at oestrus onset (0 h) and repeated every 24 h thereafter during estrus; FTAI1 (n= 199) - sows received a 5-mg (4 ml) i.m. injection of pLH at oestrus onset, and were inseminated 24 h after; and FTAI2 (n= 199) - sows received 5 mg of pLH and were inseminated at oestrus onset (0 h) and 24 h after. PCAI with homospermic doses (1.5 x 10⁹ total sperm cells/50 ml) were performed in sows in all treatment groups. Hormonal

treatment did not affect ($P>0.05$) the interval between oestrus onset and ovulation (overall 32.4 h). There were no differences ($P>0.05$) in farrowing rate (overall 91.6%) and litter size (overall 12.6 piglets born) among treatments. Total piglets born per insemination dose was different ($P<0.0001$) among the treatments (4.5, 12.5 and 6.2 for Control, FTAI1 and FTAI2, respectively). The use of pLH at oestrus onset followed by a single fixed-time PCAI 24 h after does not compromise the reproductive performance of multiparous sows.

Keywords: Swine, fixed-time insemination, porcine luteinizing hormone, ovulation, post-cervical insemination

1. Introduction

An efficient and commercially applicable artificial insemination (AI) protocol requires procedures capable of providing high or reasonable fertility rates using low sperm numbers per insemination dose (Roca et al., 2006). Within this perspective, techniques such as PCAI allow semen deposition with reduced number of sperm cells per AI dose. This technique maintains or even increases fertility using a reduced number of sperm cells, compared to cervical artificial (CAI) insemination (Watson and Behan, 2002; Rozeboom et al., 2004), allowing an increased use of genetically superior boars.

Considering that the fertilization rate is optimized when AI is performed over a period of 24 h before and a few hours after ovulation (Soede et al., 1995; Nissen et al., 1997), multiple AIs during oestrus are performed in traditional AI protocols, with at least one AI performed within an optimal time window for fertilisation. Large variations in the interval between oestrus onset and ovulation have been observed in swine females (Weitze et al., 1994). Although a reliable predictor of ovulation time would be worthwhile, it is not yet available (Soede and Kemp, 1997). The use of an efficient

ovulation inductor is important when applying fixed-time artificial insemination (FTAI) protocols (Brüssow et al., 2009). In this context, porcine luteinising hormone (pLH) has been used in association with eCG at weaning (Cassar et al., 2005; Bennett-Steward et al., 2008) or after altrenogest treatment in gilts (Degenstein et al., 2008). However, there is a lack of information about the use of pLH at oestrus onset in a protocol including fixed-time post-cervical insemination without previous exogenous hormonal treatment. More recently, no impairment in the reproductive performance of swine females was observed when pLH was used at oestrus onset, with the sows receiving a single or double fixed-time intracervical insemination (Zak et al., 2010, 2011).

This study aimed to evaluate the effect of pLH application at oestrus onset on the time of ovulation. Furthermore, the reproductive performance of sows receiving pLH, in association with single or double fixed-time PCAI, was compared to that of weaned sows submitted to multiple post-cervical inseminations without previous hormonal treatment.

2. Materials and methods

All the experimental procedures described in this study were conducted under an experimental license (Project number 22979) from the Institutional Animal Care and Use Committee (COMPESQ-FAVET-UFRGS).

2.1 Animals

The experiment was performed in a breeding herd, with an inventory of 6200 sows, located in southern Brazil, the Santa Catarina State, from January to July, 2012. A total of 597 weaned Landrace x Large White/Duroc sows - Agroceres PIC 1062[®] (Agroceres PIC, Patos de Minas, MG, Brazil) were bred.

2.2 Housing and feeding

After weaning, the sows were placed into a gestation system, and bred and maintained in individual crates with slatted floor and automatic feeders during breeding and gestation. They were moved to farrowing rooms within 3-5 days before their expected farrowing. *Ad libitum* access to water was provided to the sows throughout the experimental period. From weaning up to 30 days of gestation, they were fed 2.4 kg/day of a corn-soybean diet (14% CP, 0.65% digestible lysine and 3,200 kcal ME/kg). From 31 to 90 days of gestation, they received between 1.6 and 2.4 kg of feed per sow and from 91 to 110, 3.0 to 4.0 kg. From 110 days of gestation until farrowing, sows received no more than 2 kg of feed per day.

2.3 Oestrus detection and ultrasound examination

Oestrus detection was performed once a day (08:00 a.m.). Sows had nose-to-nose contact with a mature teaser boar together with the backpressure test; those exhibiting a standing reflex were considered to be in oestrus. Transcutaneous ultrasonography (US) of ovaries was performed by real-time ultrasonography using a 5-MHz convex linear transducer (Aloka[®] SSD 500, Aloka Co. Ltd., Tokyo, Japan). Ultrasonographic evaluations started at oestrus onset and were performed at 24-h intervals up to ovulation. A further scan was performed the next day to confirm ovulation. These evaluations were used to confirm whether at least one insemination was performed within the period considered as ideal (Kemp and Soede, 1996). In 156 sows, 52 per treatment group, oestrus detection and ultrasonographic evaluations were performed at 8-h intervals (00:00, 08:00 and 16:00) to evaluate the interval between oestrus onset and ovulation.

2.4 Experimental design

Sows detected in oestrus between 2 and 6 days after weaning were homogeneously distributed within three treatment groups (trios) according to parity, mean lifetime number of piglets born, previous lactation duration, number of weaned piglets and body condition score at insemination on a scale of five points (Young et al., 2004). Selected sows had, on average, 4.5 ± 0.04 (means \pm SEM) parities, 12.9 ± 0.06 mean lifetime piglets born, 10.7 ± 0.06 weaned piglets, 22.0 ± 0.06 days of lactation, 4.3 ± 0.02 days of interval between weaning and oestrus, and a body condition score of 3.1 ± 0.01 points.

Distribution of sows into the treatment groups was performed over 13 weeks, with approximately 45-50 sows each week. The treatments were as follows: Control (n=199) - the first insemination was performed at oestrus onset (0 h) and repeated every 24 h thereafter while the sows were on standing oestrus; FTAI1 (n=199) - sows received a 5-mg (4 ml) i.m. injection of pLH (Lutropin-V[®] Bioniche Animal Health, Belleville, Ontario, Canada) at oestrus onset, and were inseminated once, 24 h after pLH application; and FTAI2 (n=199) - sows received the same hormonal treatment as FTAI1 sows, but they were inseminated twice (at oestrus onset and 24 h after).

2.5 Semen collection and processing

The artificial insemination doses were obtained from six terminal siring boars (Pietran x Duroc x Large White x Landrace) of Agroceres PIC[®] genotypes (Agroceres PIC, Patos de Minas, MG, Brazil), with fertility proven in a previous experiment (Kummer et al., 2013). Sperm motility evaluation and concentration were obtained using a computer assisted semen analyzer – CASA system (*Sperm Vision*[®] 3.7 Minitube

GmbH, Tiefenbach, Germany). Only ejaculates with sperm displaying more than 70% motility and morphological defects below 20% were used. Ejaculates were used in a split sample basis, i.e., doses used for each trio of sows were produced from the same ejaculate. Homospermic doses with 1.5×10^9 total sperm cells were diluted in Beltsville Thawing Solution (BTS[®] Minitube GmbH, Tiefenbach, Germany) in a final volume of 50 ml and stored at 15-17°C to be used within a maximum of 72 h after semen processing.

2.6 Artificial insemination

All sows were inseminated using the PCAI method, which was performed without the presence of a boar in front of the sows. A standard artificial insemination foam tip catheter (Ponta de Espuma Bretanha[®], Passo Fundo, Brazil) was inserted through the vagina and fixed at the cervix. After the fixing, a soft and narrow inner catheter, with a diameter of 4 mm and a length of 750 mm (Magaplus S[®] Magapor, Zaragoza, Spain), was inserted up to 200 mm beyond the tip of the standard catheter, allowing the PCAI. The occurrence of semen backflow during insemination was recorded when an estimated amount of at least approximately 5 ml was observed. The occurrence of bleeding during insemination was also recorded.

2.7 Statistical analysis

The study began with 620 sows, but 11 sows were excluded from the analyses due to the inability to insert the intrauterine catheter after fixing the standard catheter. Another 12 sows were excluded because it was not possible to compose trios based on the selection criteria. Thus, 597 sows remained for the analysis.

All data were analysed using the software *Statistical Analysis System* - SAS version 9.1 (SAS, 2005). The Chi-Square or the Fisher test was used to analyse the results concerning the farrowing rate and the percentages of sows ovulating at different intervals after pLH injection.

The number of piglets born, piglets born alive, and piglets born per semen dose were analysed using the MIXED procedure, with the means compared by the Tukey-Kramer test. The fixed effect of treatments, the random effect of the boar and the week of the study, in addition to the mean lifetime number of born piglets, as a covariate, were included in these models.

Farrowing rate and litter size were also examined by taking into account the time of insemination within the optimal interval between oestrus onset and ovulation (between 0 and 24 h before ovulation) and the presence or not of semen backflow or bleeding during insemination.

3. Results

All sows ovulated within 56 h after oestrus onset (Figure 1). There was no difference among treatments ($P > 0.05$) in the interval between oestrus onset and ovulation in the sows scanned at 8-h intervals. On average, ovulation occurred at 30.3 ± 1.34 (mean \pm SEM), 33.1 ± 1.34 and 33.7 ± 1.58 h after oestrus onset, respectively, for FTAI1, FTAI2 and control sows.

There was no difference ($P > 0.05$) among treatments in farrowing rate, total number of piglets born and piglets born alive. The number of piglets born per IA dose was different ($P < 0.0001$) among the treatments (Table 1).

Insemination outside the time window of the optimal interval did not affect the farrowing rate ($P > 0.05$) in Control and FTAI2 sows, but reduced the farrowing rate in

FTAI1 sows (Table 2). The number of piglets born was not affected by the insemination being performed outside the optimal interval in all the treatment groups ($P > 0.05$; Table 2).

Overall, the absence of backflow in all inseminations, presence of backflow in one insemination and in more than one insemination were observed in 72.4% (432/597), 22.1% (132/597) and 5.5% (33/597) of the sows, respectively. The occurrence of backflow during insemination had no influence on farrowing rate ($P > 0.05$) in Control and FTAI2 sows (Table 3). However, FTAI1 sows with semen backflow had a lower farrowing rate ($P < 0.05$) compared to sows without backflow. The presence of backflow in the single AI performed in FTAI1 sows reduced their litter size (Table 3). A smaller litter size was observed in Control sows when backflow was present in at least two inseminations ($P < 0.05$).

Eighteen sows (3.0%) bled during insemination, 11 and 7 from the Control and FTAI2 groups, respectively. The presence of blood at insemination reduced ($P = 0.055$) the farrowing rate (77.8% vs. 92.1%), but not the litter size (12.5 ± 0.84 vs. 12.6 ± 0.29).

4. Discussion

The administration of exogenous pLH at oestrus onset in weaned sows, together with once daily oestrus detection and a single fixed-time PCAI, is an interesting tool to optimise labour use and the dissemination of genes from high indexing boars. In the present study, it was possible to apply single fixed-time PCAI, associated with oestrus detection once daily, without compromising the reproductive performance of sows.

Pig is a spontaneously ovulating species that shows great individual variation between the onset of oestrus and ovulation, ranging from 15 to 85 h (Weitze et al.,

1994). Ovulation takes place at the onset of the last third of the oestrus period, but the duration of oestrus is highly variable within and between farms (Soede and Kemp, 1997). Exogenous pLH has been successfully used to induce ovulation within a known interval, together with a previous application of eCG, at weaning (Cassar et al., 2005; Abad et al., 2007) or 24 h after weaning (Candini et al., 2004). In the present study, the time of ovulation, relative to pLH application, was shorter (31.5 h) than the 37-38 h previously reported (Candini et al., 2004; Cassar et al., 2005; Abad et al., 2007), probably because pLH was administered when sows were already in oestrus, without a previous application of eCG at weaning or soon after as in the aforementioned studies. In the study of Cassar et al. (2005), even with the isolated use of pLH 80 h after weaning, more sows ovulated within 40 h after pLH application than sows without hormonal treatment. By contrast, the sows in the present study did not anticipate their ovulation after the administration of 5 mg of pLH at oestrus onset. It must be pointed out that a small number of late-ovulating sows were observed even in our control group, i.e., less than 10% of control sows ovulated within 48 h after oestrus onset, compared to 25% observed in a previous study (Cassar et al., 2005).

The magnitude of FSH secretion or treatment with gonadotrophins during the time when follicles are just starting to mature for ovulation may affect the number of ovulatory follicles (Guthrie et al., 1990). Gonadotrophins may be used after weaning to stimulate follicle development and achieve better synchronisation of oestrus onset and ovulation (Brüssow et al., 2009). The follicle development induced by applying hormones at weaning (Cassar et al., 2005; Bennett-Stewart et al., 2007, 2008; Cassar et al., 2010) seems to play a major role in yielding a follicle population responsive to exogenous pLH at oestrus onset. Degenstein et al. (2008) suggested that hormonal stimulation, previous to pLH application, may improve follicle development, increasing

the proportion of medium follicles and inducing smaller follicles to ovulate. Overall, it seems that ovulation is better controlled within a specific time interval after pLH application, when both eCG and pLH are involved, in contrast to the use of pLH alone at oestrus onset, as performed in the present study.

The similar farrowing rates observed among the treatment groups is in agreement with the results of previous studies in which 5 mg of pLH were administered at oestrus onset followed by double (Zak et al., 2010) or single (Zak et al., 2011) fixed-time insemination. However, when applying a double FTAI protocol, Zak et al. (2010) observed a larger litter size compared to the control standard herd AI protocol. It was speculated that pLH, in addition to its role in ovulation and luteinisation (Soede et al., 1994, 2011), could control oviductal motility and contribute to the synchronisation of events leading to fertilisation and migration of embryos towards the uterus (Gawronska et al., 2000). In the present study, the fact that the single fixed-time protocol gave similar results to those of multiple inseminations indicates the benefits of using boars with known fertility and excluding sows more predisposed to reproductive failure. It has been proven that sub-fertile boars, even when semen doses are produced on a pool basis (Foxcroft et al., 2008; Dyck et al., 2011), have a negative impact on reproductive performance (Foxcroft et al., 2010). Furthermore, no repeat breeders were used and sows were selected by taking into account several characteristics (parity, weaning-to-oestrus interval, lactation duration, body condition score, previous total born and weaned piglets) known to have a great impact on female reproductive performance (Koketsu and Dial, 1997, 1998).

Variations in the interval between insemination and ovulation affect the fertilisation rate, with good fertilisation results being usually obtained when insemination is performed between 0 and 24 h before ovulation (Soede et al., 1995;

Kemp and Soede, 1997). Sows subjected to multiple inseminations during oestrus normally receive at least one insemination within the optimal insemination-ovulation interval. This was the case of the present study, in which 98% of the control sows received at least one insemination within the optimal interval, in contrast to 86.9% and 84.9% of the FTAI1 and FTAI2 sows, respectively. Performing the insemination outside the optimal interval seems more critical when sows are single-inseminated, as evidenced by the reduction in the farrowing rate of FTAI1 sows. Within this group, 5 out of the 26 sows inseminated outside the optimal interval received the single insemination after ovulation, and only 40% of them farrowed, confirming that single post-ovulatory insemination can compromise fertilisation rate (Soede et al., 1995) and embryo survival (Nissen et al., 1997). On the other hand, even in the suboptimal periods, when the insemination is performed early relative to ovulation (>24 h before), good fertilisation rate (Kemp and Soede, 1997) or farrowing rate (Bortolozzo et al., 2005) can be obtained. Indeed, a farrowing rate of 81% (17/21) was observed in FTAI1 sows inseminated more than 24 h before ovulation.

According to Steverink et al. (1998), semen backflow may be a physiologically normal process in swines, but information about semen backflow during PCAI is scarce. Generally, PCAI results in lower percentages of volume (Hernández-Caravaca et al., 2012) and sperm cells (Hernández-Caravaca et al., 2012; Sbardella, 2013) flowing back up to 60 min after semen deposition compared to CAI. Semen backflow during PCAI occurred in 27.6% of the sows (165/597), which is similar to the 23% observed by Sbardella (2013), but different to the findings of previous studies in which no semen backflow is reported during intrauterine insemination (Bennemann et al., 2004; Mezalira et al., 2005).

Since the concentration of spermatozoa in backflow decreases as the time from insemination to backflow collection increases (Steверink et al., 1998), it is important to note semen backflow occurring during insemination or soon after. Although it is expected that multiple inseminations mask a possible negative impact of semen backflow on reproductive performance (Sbardella, 2013) compared to single insemination, the presence of backflow in more than one PCAI reduced the litter size in Control sows, which received multiple inseminations. Semen backflow seems to be more critical when females receive only one insemination per oestrus and a low number of sperm cells (Mezalira et al., 2005). This aspect probably explains the negative impact of semen backflow on the reduction of both farrowing rate and litter size in FTAII sows, which received only one insemination per oestrus.

The presence of blood during insemination in 3.0% of sows is in agreement with percentages lower than 10% observed in other studies with multiparous sows (Watson and Behan, 2002; Bennemann et al., 2004; Dallanora et al., 2004; Rozeboom et al., 2004). Although reproductive performance is not always affected by bleeding during PCAI insemination (Bennemann et al., 2004; Rozeboom et al., 2004), its negative effect on farrowing rate corroborates the higher rate of return to oestrus observed by Dallanora et al. (2004) in sows that bled during insemination.

In conclusion, the reproductive performance of weaned multiparous sows receiving a single or double fixed-time AI is not compromised by the use of pLH at oestrus onset. Single fixed-time insemination, together with oestrus detection once daily, reduces labour requirements in swine production units. Another possible benefit is the widespread use of high indexing boars by applying a single post-cervical fixed-time insemination, since 1.5×10^9 sperm cells are enough to produce a litter, compared to the 5-12 billion sperm cells per litter typically used in swine production systems.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest that would compromise the impartiality of this scientific work.

Acknowledgements

We would like to thank Capes and Agroceres PIC for their financial support. The authors are grateful to Master Genética Animal, especially to the staff of Master Carijos Unit (Papanduva, Santa Catarina, Brazil).

References

- Abad, M., Garcia, J.C., Sprecher, D.J., Cassar, G., Friendship, R.M., Buhr, M.M., Kirkwood, R.N., 2007. Effect of insemination–ovulation interval and addition of seminal plasma on sow fertility to insemination of cryopreserved sperm. *Reprod. Domest. Anim.* 42, 418–422.
- Bennemann, P.E., Mildbradt, E., Diehl, G., Weber, D., Schimidt, A.C.T., Bernardi, M.L., Wentz, I., Bortolozzo, F.P., 2004. Reproductive performance of sows submitted to intrauterine insemination at different pre-ovulatory intervals. *Anim Reprod.* 1, 106-110.
- Bennet-Steward, K., Aramini, J., Pelland, C., Friendship, R.M., 2008. Equine chorionic gonadotrophin and porcine luteinizing hormone to shorten and synchronize the wean-to-breed interval among parity-one and parity-two sows. *J. Swine Health Prod.* 16(4), 182–187.

- Bennett-Steward, K., Cassar, G., Plante, C., Friendship, R.M., Zak, L., 2007. Ovulation induction protocol using equine chorionic gonadotropin and porcine luteinizing hormone in the weaned sow. *J. Swine Health Prod.* 15(4), 194–197.
- Bortolozzo, F.P., Uemoto, D.A., Bennemann, P.E., Pozzobon, M.C., Castagna, C.D., Peixoto, C.H., Barioni Jr, W., Wentz, I., 2005. Influence of time of insemination relative to ovulation and frequency of insemination on gilt fertility. *Theriogenology* 64, 1956-1962.
- Brüssow, K.P., Schneider, F., Kanitz, W., Rátky, J., Kauffold, J., Wähner, M., 2009. Studies on fixed-time ovulation induction in the pig, in: Rodriguez-Martinez, H., Vallet, J.L., Ziecik, A.J. (Eds.), *Control of Pig Reproduction VIII*. Nottingham University Press, Nottingham, pp. 187–198.
- Candini, P.H., Moretti, A.S., Zanella, E.L., Silveira, P.R.S., Viana, C.H.C., Valentim, R., 2004. Avaliação do uso de hormônio luteinizante (LH) como indutor da ovulação em porcas. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 41, 118-123.
- Cassar, G., Friendship, R.M., Zak, L.J., Rogan, D., Kirkwood R.N., 2010. Effect of dose of equine chorionic gonadotrophin on the oestrus responses of gilts and weaned sows and effect of the interval between equine chorionic gonadotrophin and luteinizing hormone injections on sows performance. *J. Swine Health Prod.* 18, 182-186.
- Cassar, G., Kirkwood, R.N., Poljik, Z., Bennett-Steward, K., Friendship, R.M., 2005. Effect of single and double insemination on fertility of sows bred as an induced estrus and ovulation. *J. Swine Health Prod.* 13, 254-258.
- Dallanora, D., Mezalira, A., Katzer, L.H., Bernardi, M.L., Bortolozzo, F.P., Wentz, I., 2004. Desempenho reprodutivo de fêmeas suínas inseminadas pela técnica intra-uterina ou tradicional. *Pesq. Agrop. Bras.* 39, 815-819.

- Degenstein, K.L., O'Donoghue, R., Patterson, J.L., Beltranena, E., Ambrose, D.J., Foxcroft, G.R., Dyck, M.K., 2008. Synchronization of ovulation in cyclic gilts with porcine luteinizing hormone (pLH) and its effects on reproductive function. *Theriogenology* 70, 1075–1085.
- Dyck, M.K., Foxcroft, G.R., Novak, S., Ruiz-Sanchez, A., Patterson, J., Dixon, W.T., 2011. Biological markers of boar fertility. *Reprod. Domest. Anim.* 46 (Suppl 2), 55–58.
- Foxcroft, G.R., Dyck, M.K., Ruiz-Sanchez, A., Novak, S., Dixon, W.T., 2008. Identifying useable semen. *Theriogenology* 70, 1324–1336.
- Foxcroft, G.R., Patterson, J., Cameron, A., Dyck, M.K., 2010. Application of advanced AI technologies to improve the competitiveness of the pork industry. In: *Proceedings of the 21st International Pig Veterinary Society Congress, Vancouver, Canada*, p.25.
- Gawronska, B., Stepien, A., Ziecik, A.J., 2000. Role of luteinizing hormone in control of oviduct function. *Reprod. Domest. Anim.* 35, 129-133.
- Guthrie, H.D., Bolt, D.J., Cooper, B.S., 1990. Effects of gonadotropin treatment on ovarian follicle growth and granulosa cell aromatase activity in prepuberal gilts. *J. Anim. Sci.* 68, 3719-3726.
- Hernández-Caravaca, I., Izquierdo-Rico, M.J., Matás, C., Carvajal, J.A., Vieira, L., Abril, D., Soriano-Úbeda, C., García-Vázquez, F.A., 2012. Reproductive performance and backflow study in cervical and post-cervical artificial insemination in sows. *Anim. Reprod. Sci.* 136, 14-22.
- Kemp, B., Soede, N.M., 1996. Relationship of weaning-to-estrus interval to timing of ovulation and fertilization in sows. *J. Anim. Sci.* 74, 944-949.

- Kemp, B., Soede, N.M., 1997. Consequences of variation in interval from insemination to ovulation on fertilization in pigs. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 52, 79–89.
- Koketsu, Y., Dial, G.D., 1997. Factors influencing the postweaning reproductive performance of sows on commercial farms. *Theriogenology* 47, 1445-1461.
- Koketsu, Y., Dial, G.D., 1998. Interactions between the associations of parity, lactation length, and weaning-to-conception interval with subsequent litter size in swine herds using early weaning. *Prev. Vet. Med.* 37, 113-120.
- Kummer, A.B.P.H., Gaggini, T.S., Bernardi, M.L., McManus, C., Gonçalves, E.M., Wentz, I., Bortolozzo, F.P., 2013. Multivariate analyses for determining the association of field porcine fertility with sperm motion traits analyzed by computer-assisted semen analysis and with sperm morphology. *Reprod. Domest. Anim.* (doi: 10.1111/rda.12155).
- Mezalira, A., Dallanora, D., Bernardi, M.L., Wentz, I., Bortolozzo, F.P., 2005. Influence of sperm cell dose and post-insemination backflow on reproductive performance of intrauterine inseminated sows. *Reprod. Domest. Anim.* 40, 1–5.
- Nissen, A.K., Soede, N.M., Hyttel, P., Schmidt, M., D'Hoore, L., 1997. The influence of time of insemination relative to time of ovulation on farrowing frequency and litter size in sows, as investigated by ultrasonography. *Theriogenology* 47, 1571-1582.
- Roca, J., Vazquez, J.M., Gil, M.A., Cuello, C., Parrilla, I., Martinez, E.A., 2006. Challenges in pig artificial insemination. *Reprod. Domest. Anim.* 41 (Suppl. 2), 43–53.
- Rozeboom, K., Reicks, D., Wilson, M., 2004. The reproductive performance and factors affecting on-farm application of low-dose intrauterine deposit of semen in sows. *J. Anim. Sci.* 82, 2164–2168.
- SAS Institute, 2005. *SAS User's Guide*, Release 9.1.3. SAS Institute, Cary, NC.

- Sbardella, P.E., 2013. Inseminação artificial intrauterina em primíparas e suas implicações. Master Dissertation. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Soede, N.M., Helmond, F.A., Kemp, B., 1994. Periovulatory profiles of oestradiol, LH and progesterone in relation to oestrus and embryo mortality in multiparous sows using transrectal ultrasonography to detect ovulation. *J. Reprod. Fert.* 101, 633-641.
- Soede, N. M., Kemp, B., 1997. Expression of oestrus and timing of ovulation in pigs. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 52, 91-103.
- Soede, N.M., Langendijk, P., Kemp, B., 2011. Reproductive cycles in pigs. *Anim. Reprod. Sci.* 124, 251-258.
- Soede, N.M., Wetzels, C.C.H., Zondag, W., de Koning, M.A.I., B. Kemp., 1995. Effects of time of insemination relative to ovulation, as determined by ultrasonography, on fertilization rate and accessory sperm count in sows. *J. Reprod. Fert.* 104, 99-106.
- Steeverink, D.W.B., Soede, N.M., Bouwman, E.G., Kemp, B., 1998. Semen backflow after insemination and its effect on fertilization results in sows. *Anim. Reprod. Sci.* 54, 109–119.
- Watson, P.F., Behan, J.R., 2002. Intrauterine insemination of sows with reduced sperm numbers: results of commercially based field trial. *Theriogenology* 57, 1683-1693.
- Weitze, K.F., Wagner-Rietschel, H., Waberski, D., Richter, L., Krieter, J., 1994. The onset of heat after weaning, heat duration, and ovulation as major factors in IA timing in sows. *Reprod. Domest. Anim.* 29, 433-443.
- Young, M.G., Tokach, M.D., Aherne, F.X., Main, R.G., Dritz, S.S., Goodband, R.D., Nelssen, J.L., 2004. Comparison of three methods of feeding sows in gestation and the subsequent effects on lactation performance. *J. Anim. Sci.* 82, 3058–3070.

Zak, L.J., Patterson, J., Cameron, A., Hockley, D., Dyck, M.K., Foxcroft, G.R., Rogan, D., 2011. Benefits of fixed-time breeding protocols. In: Proceedings of the American Association of Swine Veterinarians, Phoenix, USA, pp. 197-200.

Zak, L.J., Patterson, J., Hancock, J., Hockley, D., Rogan, D., Foxcroft, G. R., 2010. Benefits of synchronizing ovulation with porcine luteinizing hormone in a fixed-time insemination protocol in weaned multiparous sows. *J. Swine Health Prod.* 18 (3), 125-131.

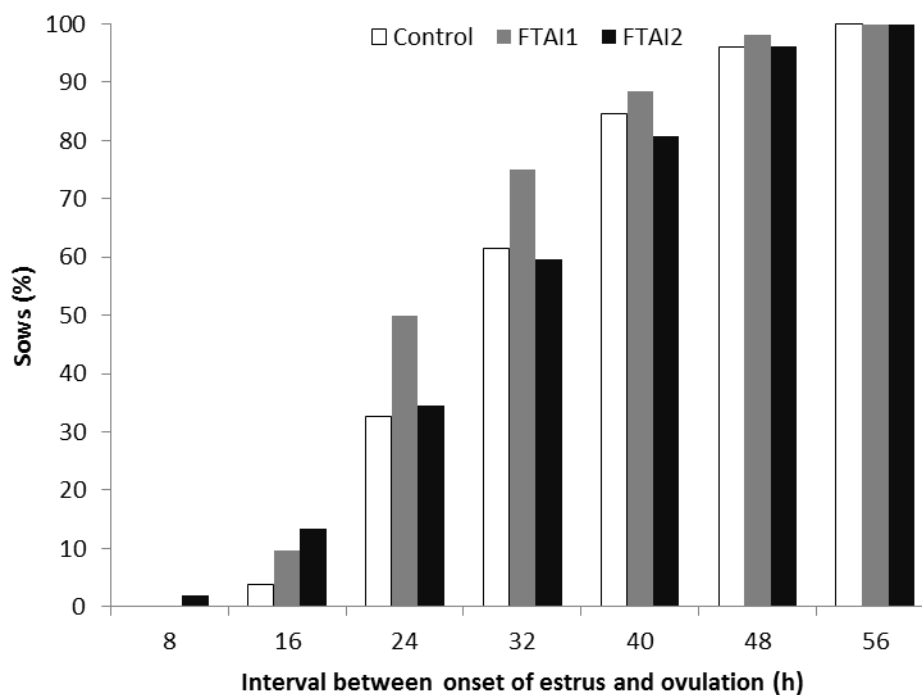


Figure 1. Cumulative frequency of ovulation time in sows evaluated at 8-h intervals (n=156).

Control: first post-cervical AI (PCAI) performed at oestrus onset (0 h) and repeated every 24 h.

FTAI1: pLH application at oestrus onset and single PCAI at 24 h after pLH application.

FTAI2: pLH application at oestrus onset and two PCAIs (at oestrus onset and 24 h after).

There was no difference ($P > 0.05$) among the groups.

Table 1. Reproductive performance of sows subjected to different post-cervical artificial insemination (PCAI) protocols (means \pm standard error of mean).

Variables	Control	FTAI1	FTAI2
Farrowing rate, %	92.0 (183/199)	90.0 (179/199)	93.0 (185/199)
Total piglets born	12.8 \pm 0.34	12.4 \pm 0.34	12.5 \pm 0.34
Piglets born alive	11.7 \pm 0.32	11.4 \pm 0.33	11.4 \pm 0.32
Piglets born/semen dose	4.54 \pm 0.22 ^a	12.47 \pm 0.22 ^b	6.25 \pm 0.22 ^c

^{a, b, c} in the same row indicate significant differences ($P < 0.05$).

Control: first PCAI performed at oestrus onset (0 h) and repeated every 24 h thereafter. Sows of this group received, on average, 2.9 AIs per oestrus.

FTAI1: pLH application at oestrus onset and single PCAI at 24 h after pLH application.

FTAI2: pLH application at oestrus onset and two PCAIs (at oestrus onset and 24 h after).

Table 2. Farrowing rate and number of piglets born in relation to the time of insemination within the optimal interval (between 0 and 24 h before ovulation) in sows subjected to different post-cervical insemination (PCAI) protocols.

Variables	Treatments	Optimal time		P-value
		Yes	No	
Farrowing rate, %	Control ^a	91.7 (178/194)	100 (4/4)	1.00
	FTAI1	92.5 (160/173)	73.1 (19/26)	0.007
(n)	FTAI2	92.9 (157/169)	93.3 (28/30)	1.00
Total piglets born	Control	12.9±0.4	10.9±1.4	0.175
	FTAI1	12.4±0.4	13±0.8	0.419
	FTAI2	12.5±0.2	12.8±0.6	0.644

^a In one sow of this group, ovulation could not be detected.

Control: first PCAI performed at oestrus onset (0 h) and repeated every 24 h thereafter. Sows of this group received, on average, 2.9 AIs per oestrus.

FTAI1: pLH application at oestrus onset and single PCAI at 24 h after pLH application.

FTAI2: pLH application at oestrus onset and two PCAIs (at oestrus onset and 24 h after).

Table 3. Farrowing rate and number of piglets born according to the occurrence of semen backflow in sows subjected to different post-cervical insemination (PCAI) protocols.

Variables	Treatments	Backflow			P-value
		0	1	2	
Farrowing rate, %	Control	93.5 (116/124)	94.0 (47/50)	80 (20/25)	0.063
	FTAI1	92.2 (154/167)	78.1 (25/32)	-	0.024
(n)	FTAI2	92.9 (131/141)	94.0 (47/50)	87.5 (7/8)	0.799
Total piglets born	Control	13.2±0.4 ^b	12.5±0.5 ^{bc}	11.5±0.7 ^c	P<0.05
	FTAI1	12.6±0.4 ^b	11.4±0.7 ^c	-	0.051
	FTAI2	12.5±0.3	12.6±0.5	12.5±1.2	0.982

^{b, c} in the same row indicate significantly different values.

Control: first PCAI performed at oestrus onset (0 h) and repeated every 24 h thereafter. Sows of this group received, on average, 2.9 AIs per oestrus.

FTAI1: pLH application at oestrus onset and single PCAI at 24 h after pLH application.

FTAI2: pLH application at oestrus onset and two PCAIs (at oestrus onset and 24 h after).

Backflow: 0= backflow absent in all the inseminations; 1= backflow present in one insemination; 2= backflow present in more than one insemination.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As mudanças e avanços ocorridos nos protocolos de inseminação artificial em suínos nos últimos anos fazem com que as novas tecnologias sejam introduzidas gradativamente na rotina das granjas comerciais, embora tecnologias precisem ser adaptadas e modificadas conforme a realidade e necessidades específicas de cada granja.

A diminuição de células espermáticas usadas por fêmea coberta e a consequente difusão de material genético de alto valor são alvos de estudos que visam melhorar o custo benefício da granja que optar pelo uso de ferramentas que possam oferecer esses ganhos, já que isso proporcionará diminuição no uso de materiais ligados aos manejos reprodutivos e racionalização da mão de obra. Assim como na granja, a cadeia produtiva também tem seus ganhos. Os resultados produtivos como conversão alimentar, ganho de peso diário e qualidade de carcaça de progênes oriundas de reprodutores geneticamente superiores são mais eficientes.

Como foi visto na revisão bibliográfica e no artigo, o uso associado de IATF e IAU vai proporcionar a diminuição do uso de células espermáticas por fêmea coberta e seus consequentes ganhos. O uso de IAU em porcas multíparas é considerado, de certa forma, fácil e bastante eficiente, e seus resultados reprodutivos, usando menos células espermáticas, não são comprometidos os índices reprodutivos quando comparados com uso de IAT. Já para o emprego de IATF é necessário que a ovulação seja induzida através do uso de fármacos. Há vários produtos utilizados para a indução da ovulação em porcas, alguns com mais ou menos eficiência, porém é necessário avaliar o custo benefício de cada um. O uso do pLH, aplicado na detecção do estro, como indutor da ovulação em multíparas não mostrou eficiência em antecipar a ovulação quando comparado com o grupo controle. Portanto o uso de apenas uma dose vai depender muito da qualidade da realização da inseminação e da dose inseminante utilizada, já que há o risco de que a IA seja realizada fora do momento ideal de cobertura, e também há fêmeas que poderão apresentar refluxo da DI, e na ocorrência dessas duas situações, o desempenho reprodutivo pode ser afetado.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

ABAD, M., GARCIA, J.C., SPRECHER, D.J., CASSAR, G., FRIENDSHIP, R.M., BUHR, M.M., KIRKWOOD, R.N. Effect of insemination–ovulation interval and addition of seminal plasma on sow fertility to Insemination of cryopreserved sperm. *Reprod. Domest. Anim.* 42, p.418–422. 2007.

ANDERSON, L.L. Ciclos reprodutivos: Suínos. In: HAFEZ, E.S.E. *Reprodução Animal*. 4 ed. Detroit: Manole, p.412-446, 1982.

BAKER, R.D., DZIUK, P.J., NORTON, H.W. Effect of volume of semen, number of sperm and drugs on transport of sperm in artificially inseminated gilts. *J Anim Sci.* v. 27, p.88-93, 1968.

BENNEMANN, P.E. Protocolos emergenciais para programas de inseminação artificial em suínos. *Acta Scientiae Veterinariae*. 36 (Supl 1): s27-s32, 2008.

BENNEMANN, P.E. Redução do número de espermatozoides por fêmea inseminada por ano. 2005. 81f. Tese de doutorado, Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

BENNEMANN, P.E., DIEHL G.N., MILBRADT E., VIDOR R.M., FRIES H.C.C., WENTZ I., BERNARDI M.L., BORTOLOZZO F.P. Artificial Insemination of gilts with 1,5 billion sperms stored in different periods associated with different pre-ovulatory intervals *Reprod. Dom. Anim.* 40, p.507-510, 2005.

BORCHARDT NETO, G., WENTZ, I., BORTOLOZZO, F.P. Fatores Relacionados com o diagnóstico de estro e momento da ovulação. In: Bortolozzo F.P., Wentz I., Bennemann P.E., Bernardi M.L., Wollmann E.B., Ferreira F.M., Borchardt N.G. *Inseminação Artificial na Suinocultura Tecnificada*. v.2, p.107-126. 2005.

BORTOLOZZO, F.P., SBARDELLA, P.E., FERRARI, C.V., WENTZ, I. Inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em suínos: é uma realidade ou apenas ficção? XV Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos. ABRAVES. Fortaleza, Ceará. ANAIS: PALESTRAS. p.192-204. 2011.

BORTOLOZZO, F.P., WENTZ, I. Inseminação Artificial de Suínos no Brasil. *Revista Brasileira da Reprodução Animal*, v.21, p.13-15, 1997.

BORTOLOZZO, F.P., WENTZ, I. Vantagens e limitações no uso da inseminação artificial em suínos. In: Bortolozzo F.P., Wentz I., Bennemann P.E.,

Bernardi M.L., Wollmann E.B., Ferreira F.M., Borchardt Neto, G. Inseminação Artificial na Suinocultura Tecnificada. v. 2, p.23-26, 2005.

BORTOLOZZO, F.P., BENNEMANN, P.E., WENTZ, I., BERNARDI, M.L. Técnica, momento e frequência de realização da inseminação artificial em suínos. In: Bortolozzo F.P., Wentz I., Bennemann P.E., Bernardi M.L., Wollmann E.B., Ferreira F.M., Borchardt N.G. Inseminação Artificial na Suinocultura Tecnificada. v.2, p.127-158. 2005.

BORTOLOZZO, F.P., WENTZ, I., DALLANORA, D. Situação atual da inseminação artificial em suínos. *Acta Scientiae Veterinariae*. 33(1), p.17- 32, 2005b.

BRUSSOW, K.P., RATKY, J., KANITZ,W., BECKER, F. The Relationship between the Surge of LH Induced by Exogenous Gn-RH and the Duration of Ovulation in Gilts. *Reprod. Dom. Anim.* 25, p.255-260, 1990.

BRUSSOW, K.P., SCHNEIDER, F., TUCHSCHERER, A., RATKY, KRAELING, R.R., KANITZ, W.J. Luteinizing hormone release after administration of the gonadotropin-releasinghormone agonist Fertilan (goserelin) for synchronization of ovulation in pigs. *J Anim Sci.* v.85, p.129-137, 2007.

BREEN, S.M., RODRIGUEZ-ZAZ, S.L., KNOX, R.V. Effect of PG600 and adjusted mating times on reproductive performance in weaned sows. *Anim. Reprod. Sci.* 93, p.157-164, 2006.

CANDINI P.H., MORETTI, A.S., SILVEIRA, P.R.S., ZANELLA, E.L., VIANA, C.H.C., SANTOS, I.C.C. Utilization of sychronized ovulation protocol, induced by porcine LH, to perform inseminations programs in fixed time, with one or two inseminations per sow. In: International Conference on Pig Reproduction. *Proceedings. Columbia, Missouri, University of Missouri.* p.99, 2001.

CANDINI, P.H., ZANELLA, E.L., SILVEIRA, P.R.S., MORETTI, A.S., VIANA, C.H.C., VALENTIM, R. Utilização de gonadotrofinas (eCG e LH) para sincronização da ovulação em fêmeas suínas desmamadas. In: IX Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos. ABRAVES. Belo Horizonte, Minas Gerais. ANAIS: PALESTRAS. p.375-376. 1999.

CANDINI, P.H., MORETTI, ZANELLA, E.L., A.S., SILVEIRA, P.R.S., VIANA, C.H.C., SANTOS, I. Única ou dupla inseminação artificial em tempo fixo em porcas com ovulações induzidas pelo Hormônio Luteinizante. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science.* 41, p.124-130. 2004.

CANDINI, P.H., MORETTI, A.S., ZANELLA, E.L., SILVEIRA, P.R.S., VIANA, C.H.C., VALENTIM, R. Avaliação do uso de Hormônio Luteinizante (LH) como indutor da ovulação em porcas. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 41, p.118-123. 2004b.

CASSAR, G., KIRKWOOD, R.N., POLJIK, Z., BENNETT-STEWART, K., FRIENDSHIP, R.M. Effect of single and double insemination on fertility of sows bred as an induced estrus and ovulation. *Journal of Swine Health and Production*. 13, p.254-258. 2005.

CASTAGNA, C.D. Considerações sobre programas de inseminação artificial e cistos ovarianos em suínos. 2002. 142f. Tese de doutorado, Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

DALLANORA, D., MEZALIRA, A., KATZER, L.H., et al. Desempenho reprodutiva de fêmeas suínas inseminadas com deposição intrauterina de sêmen e reduzido número de espermatozóide. In: XI Congresso da Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, ABRAVES. Goiânia, Goiás. ANAIS: PALESTRAS. p.213-214, 2003.

DALLANORA, D. Desempenho reprodutivo de fêmeas suínas após a inseminação artificial intrauterina ou tradicional. 2004. 53f. Dissertação de mestrado, Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

DALLANORA, D., MEZALIRA, A., KATZER, L.H. BERNARDI, M.L., BORTOLOZZO, F.P., WENTZ, I. Desempenho reprodutivo de fêmeas suínas inseminadas pela técnica intrauterina ou tradicional. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, v.39, n.8, p.815-819, 2004.

DEGENSTEIN, K.L., O'DONOGHUE, R., PATTERSON, J.L., BELTRANENA, E., AMBROSE, D.J., FOXCROFT, G.R., DYCK, M.K. Synchronization of ovulation in cyclic gilts with porcine luteinizing hormone (pLH) and its effects on reproductive function. *Theriogenology*. 70, p.1075–1085. 2008.

DIEHL, G. N., AMARAL FILHA, W. S., KUMMER, R., KOLLER, F., BERNARDI, M L., WENTZ, I., BORTOLOZZO, F. P. Nova pipeta de inseminação intrauterina em suínos. *Ciência Rural*, Santa Maria, RS, v.36, n.1, p.179-185, 2006.

FAZANO, F.A.T. Inseminação artificial em suínos. *Avicultura e Suinocultura Industrial*. São Paulo, v.50, n.826, p.101-102, 1978.

FLORES, L.A.S., WENTZ, I., BORTOLOZZO, F.P., BORCHARDT NETO, G., BALESTRIM, R.F., GAVA, G., KUMMER, R. Comparação entre diferentes métodos de inseminação artificial em suínos. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.34, n.4, p.1169-1175, 2004.

FRIES, H.C.C. Utilização de um análogo do hormônio liberador de gonadotrofinas (lecirelina) na indução e na sincronização da ovulação em porcas. 2010. 85f. Dissertação de mestrado, Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

GOONERATNE, A.D., KIRKWOOD, R.W., THATCKER, P.A. Effects of injection of gonadotropin-releasing hormone on sow fertility. *J Anim Sci*. v.69, p.123-129, 1989.

GUTHRIE H.D., BOLT, D.J. Changes in plasma follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, estrogen and progesterone during growth of ovulatory follicles in the pig. *Domestic Animal Endocrinology*. 7, p.83-91, 1990.

HANCOCK, J.L. Pig insemination technique. *Veterinary Record*. v.71, p.527, 1959.

HELMOND, F., AARNINK, A., OUDENAARDEN, C. Perioovulatory hormone profiles in relation to embryonic development and mortality in pigs. In: SREENAN, J.N., DISKIN, M.G. Embryonic mortality in farm animals. Dordrecht: Martinus Nijhoff, p.119-125, 1986.

HERNÁNDEZ-CARAVACA, I., IZQUIERDO-RICO, M.J., MATÁS, C., CARVAJAL, J.A., VIEIRA, L., ABRIL, D., SORIANO-ÚBEDA, C., GARCÍA-VÁZQUEZ, F.A. Reproductive performance and backflow study in cervical and post-cervical artificial insemination in sows. *Anim. Reprod. Sci*. 136, p.14-22, 2012.

KNOX, R.V., RODRIGUEZ-ZAS, S.L., MILLER, G.M., WILLENBURG, K.L. ROBB, J.A. Administration of PG600 to sows at weaning and the time of ovulation as determined by transrectal ultrasound. *J Anim Sci*. v.79, p.796-802, 2001.

KRUEGER, C., RATH, D., JOHNSON, L.A. Low dose insemination in synchronized girls. *Theriogenology*. 52, p.1363-1373, 1999.

KRUEGER, C., RATH, D. Intrauterine insemination in sows with reduced sperm number. *Reprod Fertil Dev*. 12(1-2), p.113-7, 2000.

LEVIS, D. G. Liquid boar semen production: current extender technology and where do we go from here! *In: IV International Conference on Boar Semen Preservation Congress. PROCEEDINGS. Beltsville, USA. p.121-128, 2000.*

LEVIS, D.G., BURROUGHS, S., WILLIAMS, S. Use of intrauterine insemination of pigs: pros, cons & economics. Ohio Pork Industry Center, 2002. Available:http://digitalcommons.unl.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1630&context=anim_malscifacpub. Date of last access: 19 November 2012.

LIPNER, H. Mechanism of mammalian ovulation. *In: Knobil, E., Neill, J. (Eds.). The Physiology of Reproduction. New York: Paves Press, p.447-488.*

PATERSON, A.M. The controlled induction of puberty. *In: Cole, D.J.A., Foxcroft, G.R. (ed.). Control of Pig Reproduction. London: Butterworths. p.139-159, 1982.*

PELLAND, C., CASSAR, G., KIRKWOOD, R., FRIENDSHIP, R. Fertility after intrauterine insemination with conventional or low numbers of spermatozoa in sows with synchronized ovulation. *J Swine Health Prod. 16 (4), p.188-199, 2008.*

PETERS, A.R. Veterinary clinical application of GnRH – Questions of efficacy. *Anim. Reprod. Sci. 88, p.155-167, 2005.*

MARCHETI, A.N. Caracterização do perfil estral do rebanho, utilização de diferentes números de espermatozoides na dose e efeito de inseminações artificiais pré e pós ovulatórias sobre o desempenho reprodutivo de suínos. 2001. 66f. Dissertação de mestrado, Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

MARCHETI, A.N., BORTOLOZZO, F.P., WENTZ, I., BORCHARDT NETO G. Efeito da utilização de 2, 3 e 4 bilhões de espermatozoides na dose inseminante sobre a taxa de retorno ao estro, taxa de parto e tamanho das leitegadas de fêmeas suínas. *ARS Veterinária. 17, p.107-112, 2001.*

MATHIAS, K. Understanding the differences between artificial insemination (AI), intra-uterine insemination (IUI), and deep intra-uterine insemination (DIUI). American Association of Swine Veterinarians, 2003.

MARTINEZ, E.A., VAZQUEZ, J.M., ROCA, J., LUCAS, X., GIL, M.A., PARRILLA, I., VASQUEZ, J.L., DAY, B.N. Successful non-surgical deep intrauterine insemination with small numbers of spermatozoa in sows. *Reproduction. v.122, p.289-296, 2001.*

MELLAGI, A.P.G., BERNARDI, M.L., WENTZ, I., BORTOLOZZO, F.P. Manejo para indução da puberdade na leitoa. In: Bortolozzo F.P., Wentz I., Bernardi M.L., Kummer, R., Amaral Filha, W.S., Mellagi, A.P.G., Furtado, C.S.D. (Eds). A fêmea suína de reposição. v.3, p.69-85. 2006.

MEZALIRA, A., DALLANORA, D., BERNARDI, M.L., WENTZ, I., BORTOLOZZO, F.P. Influence of Sperm Cell Dose and Post-insemination Backflow on Reproductive Performance of Intrauterine Inseminated Sows. *Reprod. Dom. Anim.* 40, p.1-5, 2005.

MILLER, J., ALVARENGA, A.L.N., MURGAS, L.D.S., SILVA, A.C., ARAÚJO, R.S., LIMA, D. Sperm concentration on the intrauterine artificial insemination in swine. *Ciênc. Agrotec.* 33 (6), p.1671-1674, 2009.

MOZO-MARTÍN, R., GIL L., GÓMEZ-RINCÓN, C.F., DAHMANI, Y., GARCÍA-TOMÁS, M., ÚBEDA, J.L., GRANDÍA. J. Use of a novel double uterine deposition artificial insemination technique using low concentrations of sperm in pigs. *The Veterinary Journal.* 2011, doi:10.1016/j.tvjl.2011.11.007

NISSEN, A.K., SOEDE, N.M., HYTTEL, P., SCHMIDT, M., D'HOORE, L. The influence of time of insemination relative to time of ovulation on farrowing frequency and litter size in sows, as investigated by ultrasonography. *Theriogenology.* v. 47, (8), p.1571-158, 1997.

OHATA, P.M. A influência do período de equilíbrio, do plasma seminal e da sensibilidade dos machos ao resfriamento na congelabilidade do sêmen suíno. 81p. 2001. Dissertação de mestrado, Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

REIS, G. R., OHATA, P. M., SCHWARZ, P., BERNARDI, M. L., CASTAGNA, C.D., BORTOLOZZO, F. P., WENTZ, I. Identificação de cachacos com diferentes períodos de viabilidade *in vitro*. In: III Simpósio internacional Minitub - Inseminação artificial em suínos, Flores da Cunha, Rio Grande do Sul. ANAIS: PALESTRAS. p.42-49. 2000.

RIESENBECK, A. Review on International Trade with Boar Semen. *Reprod. Dom. Anim.* 46 (Suppl. 2), p.1-3. 2011.

SCHEID, I.R. Commercial swine insemination in Brazil: Development and current use. In: II International Conference on Boar Semen Preservation. Berlin . PROCEEDINGS . Berlin, Germany. p.299-302, 1991.

SOEDE, N.M., HELMOND, F.A., KEMP, B. Perioovulatory profiles of oestradiol, LH and progesterone in relation to oestrus and embryo mortality in multiparous sows using transrectal ultrasonography to detect ovulation. *Journal of Reproduction and Fertility*. v. 101, p. 633-641, 1994.

SOEDE, M.N., WETZELS, C.C.H., ZONDAG, W., DE KONING, M.A.I., KEMP, B. Effects of time of insemination relative to ovulation, as determined by ultrasonography, on fertilization rate and accessory sperm count in sows. *Journal of Reproduction and Fertility*. v.104, n.1, p. 99-106, 1995.

SOEDE, N.M., KEMP, B. Expression of oestrus and timing of ovulation in pigs. *Journal of Reproduction and Fertility*. Supplement 52, p.91-103, 1997.

STEVERINK, D.W.B., SOEDE, N.M., BOUWMAN, E.G., KEMP, B. Semen backflow after insemination and its effect on fertilization results in sows. *Anim. Reprod. Sci.* 54, p.109–119, 1998.

STEVERINK, D.W.B. Duration of estrus in relation to reproduction results in pigs on commercial farms. *J Anim Sci*. v.77, p.801-809, 1999.

STRATMAN, F.W., SELF, H.L. Effect of semen volume and number of sperm on fertility and embryo survival in artificially inseminated gilts. *J Anim Sci*. v.19. p.1081-1088, 1960.

UEMOTO, D.A. Comportamento estral e desempenho reprodutivo em leitoas submetidas à inseminação artificial em diferentes períodos pré-ovulatórios. 1999. 96f. Dissertação de mestrado, Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

VAZQUEZ, J.M., MARTINEZ, E.A., ROCA, J., GIL, M.A., PARRILLA, I., CUELLO, C., CARVAJAL, G., LUCAS, X., VAZQUEZ, J.L. Improving the efficiency of sperm technologies in pigs: the value of deep intrauterine insemination. *Theriogenology*. 63, p.536–547, 2005.

VIANA, C.H.C. Avaliação dos intervalos inseminação-ovulação, desmame-cio e da duração do cio como parâmetros na determinação de programas alternativos de inseminação artificial em suínos. 2001. 76f. Tese. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

WABERSKI, D., WEITZE, K.F., LIETMANN, C., LÜBBERT ZUR LAGE, C., BORTOLOZZO, F.P., WILLMEN, T., PETZOLDT, R. The initial fertilizing capacity

of longerm-stored liquid boar semen following pre- and postovulatory insemination. *Theriogenology*, v.41, p.1367-1377, 1994.

WATSON, P.F., BEHAN, J.R. Intrauterine insemination of sows with reduced sperm numbers: results of commercially based field trial. *Theriogenology*. 57, p.1683-1693. 2002.

WEITZE, K.F. Long-term storage of extended boar semen. *Reprod. Dom. Anim. Supplement. v. 1*, p.231-253, 1991.

WEITZE, K.F. The use of “long-term extender” in pig AI – a view of the international situation. *Pigs News and Information*, v.11, n.1, p.23-26. 1990.

WEITZE, K.F., WAGNER-RIETSCHER, H., WABERSKI, D., RICHTER, L., KRIETER, J. The onset of heat after weaning, heat duration, and ovulation as major factors in IA timing ins sows. *Reprod. Dom. Anim.* v.29, n.7, p.433-443, 1994.

WEITZE, K.F. Update on worldwide application of swine artificial insemination. *In IV International Conference on Boar Semen Preservation Congress. PROCEEDINGS*. Beltsville, USA. p.115-118, 2000.

WENTZ, I., BORTOLOZZO, F.P. Inseminação artificial em suínos. *In: Suinocultura Intensiva: Produção, manejo e saúde do rebanho*. 2 ed., Concórdia, 1998.

WENTZ, I., VARGAS, A.J., BORTOLOZZO, F.P. et al. Situação atual da inseminação artificial em suínos no Brasil e viabilização econômica do emprego dessa biotécnica. *In: III Simpósio internacional Minitub - Inseminação artificial em suínos*, Flores da Cunha, Rio Grande do Sul. *ANAIS: PALESTRAS*. p.13-33, 2000.

ZAK, L.J., PATTERSON, J., HANCOCK, J., HOCKLEY, D., ROGAN, D., FOXCROFT, G. R. Benefits of synchronizing ovulation with porcine luteinizing hormone in a fixed-time insemination protocol in weaned multiparous sows. *Journal of Swine Health and Production*. 18 (3), p.125-131. 2010.

ZAK, L.J., PATTERSON, J., CAMERON, A., HOCKLEY, D., DYCK, M.K., FOXCROFT, G.R., ROGAN, D. Benefits of fixed-time breeding protocols. *In: American Association of Swine Veterinarians. PROCEEDINGS*. Phoenix, USA. p.197-200. 2011.

ZAPLETAL, D., PAVLIK, A. The effect of lecirelin (GnRH) dosage on the reproductive performance of nulliparous and lactanting rabbit does. *Anim. Reprod. Sci.* 104, p.306-315, 2008.