



## Identificação de paternidade para avaliação da contribuição da primeira e segunda doses inseminantes na composição da leitegada suína

Paulo Roberto Souza da Silveira<sup>1</sup>, Robson José Cesconeto<sup>2</sup>, Eraldo Lourenso Zanella<sup>3</sup>, Waldomiro Barioni Junior<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Embrapa Suínos e Aves, Vila Tamanduá, Caixa Postal 21, Tel.: (49) 3441-0400 - Concórdia, SC.

<sup>2</sup> Mestre em Reprodução Animal - Orleans, SC.

<sup>3</sup> Universidade de Passo Fundo - UPF, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Hospital Veterinário, Passo Fundo, RS.

<sup>4</sup> Embrapa Suínos e Aves.

**RESUMO** - Cinquenta matrizes suínas foram inseminadas em um protocolo de duas inseminações por estro (12 horas e 36 horas) para determinação da contribuição individual das doses inseminantes na composição da leitegada. A identificação da paternidade se baseou na análise de microssatélites. A primeira e a segunda dose contribuíram, respectivamente, com 34,8% e 65,2% de todos os nascimentos. Em 80% das leitegadas, nasceram leitões gerados pelo sêmen das duas doses (leitegadas mistas). Leitegadas com filhos exclusivamente da primeira ou da segunda dose, respectivamente, representaram 10% cada uma. Apesar de aplicada antes da metade do estro, a primeira inseminação esteve presente em 90% das leitegadas.

Palavras-chave: composição da leitegada, identificação de paternidade, inseminação artificial

## Identification of paternity of piglets to determine the contribution of the first or the second insemination to the offspring composition

**ABSTRACT** - A protocol of two inseminations (12h and 36h; time schedule) per estrous was applied in fifty sows in order to study the individual influence of the insemination order on the offspring composition. Analyses of microsatellites were used for identification of the paternity. The first and the second inseminations contributed respectively with 34.8% and 65.2% of all piglets that were born. Piglets were born from both inseminations (mixed litters) in 80% of the farrowings. Each of the first or the second insemination contributed to 10% of the litters. Although the first insemination was applied before the first half of the estrous, it contributed to the piglets that were born in 90% of the farrowings.

Key Words: artificial insemination, litter composition, paternity identification

### Introdução

O uso de duas ou mais inseminações por estro em cada fêmea suína é praticado em razão da duração relativamente longa do estro, com horários de ovulação muito variáveis (Steverink, 1999). Assim, pode-se garantir durante maior período a presença de um número suficiente de espermatozoides nas tubas uterinas para fertilizar a maioria dos ovócitos no momento da ovulação. A prática de utilizar múltiplas inseminações por estro em fêmeas suínas promove aumento de até 10% na taxa de parição, além de pequeno aumento no número de nascidos por parto, em comparação ao uso de uma única inseminação artificial (Tilton & Cole, 1982; Xue et al., 1998; Viana, 2001; Afonso et al., 2001).

Segundo alguns autores, fatores como ordem de parto (Steverink et al., 1997; Belstra et al., 2004), duração da lactação (Borchardt Neto, 1998; Belstra et al., 2004) e inter-

valo da desmama ao início do estro (Weitze & Waberski, 1994; Weitze et al., 1994; Belstra et al., 2004) estão correlacionados à duração do estro, que está correlacionada ao momento da ovulação (Soede & Kemp, 1997; Borchardt Neto, 1998). Contudo, esses parâmetros estão significativamente correlacionados à duração do estro e ao momento da ovulação (Steverink et al., 1997; Viana, 2001; Correa et al., 2001), impedindo seu uso como preditores para elaboração de protocolos de inseminação artificial. Existem poucos estudos na literatura internacional com identificação de paternidade de cada leitão nascido considerando cada uma das doses inseminantes aplicadas em uma porca durante mesmo estro.

O aumento do conhecimento sobre o efeito da utilização de cada dose em determinado protocolo de inseminação artificial poderia auxiliar os produtores a refinar seus protocolos de inseminação e aumentar a eficiência reprodutiva.

Este trabalho foi realizado para obtenção de informações precisas sobre a contribuição da primeira e da segunda dose inseminante, aplicadas durante um mesmo estro, na composição de cada leitegada considerando a determinação genética da paternidade.

## Material e Métodos

Foram utilizadas 50 fêmeas suínas híbridas do plantel de uma granja experimental, localizada no Oeste Catarinense, com ordem de parto variando de 3 a 5 e intervalo da desmama ao estro de 3 a 5 dias. Como doadores de sêmen, foram utilizados um macho da raça Duroc (macho A) e um da raça Pietran (macho B). Depois de desmamadas, as fêmeas foram conduzidas ao setor de cobertura e alojadas em gaiolas metálicas individuais, onde foram mantidas até a confirmação da gestação (52 dias), quando foram transferidas para baias coletivas com capacidade para até seis fêmeas, onde permaneceram até o final da gestação.

As fêmeas foram alimentadas duas vezes ao dia com ração contendo 3.150 kcal/kg de energia metabolizável (EM), 14% de proteína bruta (PB) e 4,7% de fibra bruta (FB).

Como tratamentos, foram aplicadas duas doses de sêmen contendo 3 a 4 bilhões de espermatozoides diluídos em BTS (Beltsville Thawing Solution) para um volume final de 100 mL, armazenadas a 16°C ( $\pm$  1°C) por no máximo 36 horas a partir da coleta, provenientes somente dos machos selecionados para o experimento, conforme delineamento pré-estabelecido (Tabela 1).

Considerou-se início do estro o momento em que a fêmea apresentou a primeira resposta positiva (RT +) ao teste de pressão lombar (TPL). Para identificação do estro, duas vezes ao dia (8h30 e as 16h30) um macho não-castrado treinado foi conduzido frente às fêmeas, mantendo um contato de no mínimo cinco minutos, enquanto um funcionário experiente fazia o TPL para o diagnóstico do RT.

Na análise genética dos indivíduos, utilizaram-se cinco marcadores de microssatélites presentes nos cromossomos 1, 4, 5 e 7 do genoma suíno, descritos por Johansson et al.

(1992), Ellegren et al. (1993) e Looft et al. (1995), mais especificamente os locos de microssatélite S0082, S0097, TNFm1, TNFm2 e IGF-1, utilizados com sucesso na identificação de paternidade por Stahlberg (1996) e Stahlberg et al. (2000), utilizando-se DNA genômico dos pais e dos filhos, com protocolos adaptados de Sambrook & Russel (2001). As reações de PCR foram feitas em um volume de 25 mL conforme esquematizado na Tabela 2.

As reações foram colocadas em um termociclador GeneAmp PCR System 2400<sup>2</sup> para a amplificação utilizando-se um programa de "Touch Down PCR", na temperatura de anelamento descrita para cada primer. A eletroforese foi realizada em gel de acrilamida desnaturante a 6% com uréia, aplicando-se voltagem de 1370 V, 60 mA e 60 W por 90 minutos, em uma cuba de seqüenciamento manual: SQ3 Sequencer (Hoefertm). O produto das PCRs foi preparado para a eletroforese pela adição de 16,67  $\mu$ L de tampão de corrida com formamida nas reações. Ao término da eletroforese, o gel foi fixado e corado com nitrato de prata, conforme protocolo modificado de Reginato & Coutinho (2001).

A análise estatística dos dados foi realizada por meio do programa SAS (2001), considerando a significância para o erro tipo  $\alpha = 0,05$ . Os dados relativos à fertilidade *in vivo* e *in vitro* dos machos foram analisados pelo procedimento ANOVA.

Os índices zootécnicos referentes às fêmeas incluídas no experimento foram reunidos por meio das médias simples e correlacionados pelo cálculo do coeficiente de correlação de Pearson.

A comparação entre o número de nascidos entre os partos anterior e o atual, bem como entre o número de nascidos entre os tratamentos e entre os partos, foi realizada pelo procedimento ANOVA. Utilizando-se os resultados da análise dos contrastes mutuamente ortogonais, buscou-se detectar a existência de interação das doses de sêmen que pudesse ter favorecido algum dos tratamentos, bem como identificar se os machos apresentaram diferenças na fertilidade durante a aplicação dos tratamentos.

A comparação do número de nascidos entre as inseminações, assim como entre as médias de nascidos por inseminação (primeira e segunda) entre os tratamentos 3 e 4 e a comparação do número de nascidos entre os machos usados no experimento, foi realizada pelo procedimento ANOVA, para a análise da variância. Assim, foi possível avaliar se as diferenças entre nascidos de cada inseminação poderiam ser atribuídas exclusivamente aos tratamentos, de modo a monitorar qualquer possível viés decorrente da menor fertilidade de determinado cachaço.

Tabela 1 - Delineamento experimental

Tratamento	N <sup>o</sup> de fêmeas	1 <sup>a</sup> inseminação	2 <sup>a</sup> inseminação
1	10	A	A
2	10	B	B
3	10	A	B
4	10	B	A
5	10	A/B	A/B

A = macho Duroc; B = macho Pietran.

A primeira inseminação foi realizada 12 horas após o início do reflexo de tolerância ao cachaço (RT) e a segunda inseminação 24 horas após a primeira.

Tabela 2 - Componentes e valores utilizados em PCR na análise genética dos leitões

Microssatélite	PCR buffer	DNTPs ( $\mu$ M)	MgCl <sub>2</sub> (mM)	Amostra de DNA (ng)	Taq DNA polimerase <sup>1</sup>	Primers + e - ( $\mu$ g)
S0082	1x	200	2,5	100	0,5 U	50
S0097	1x	200	3	100	0,5 U	150
TMF-m1	1x	200	3	100	0,5 U	150
TMF-m2	1x	200	3	100	0,5 U	150
IGF-I	1x	200	3	100	0,5 U	150

Para os microssatélites TMF-m1, TMF-m2 e IGF-I, foram testadas também concentrações de 1,5; 2; 2,5 mM de MgCl e quantidades de 50 e 100 mg de cada primer.

## Resultados e Discussão

Como não foi possível neste experimento, por falta do equipamento necessário, determinar pelo uso de ultra-som o intervalo do início do estro ao momento da ovulação (Tabela 3), pode-se apenas inferir que esse intervalo se manteve na faixa de variação apresentada na literatura (Weitze et al., 1994; Soede & Kemp, 1997; Borchardt Neto, 1998; Belstra et al., 2004). A informação retrospectiva da duração do estro obtida neste experimento foi de 2,87 dias ou 68,8 horas (Tabela 3, Figura 1). Conforme informações da literatura de que a duração do estro é um preditor confiável (Soede et al., 1997; Soede et al., 1995; Nissen et al., 1997) e situa a ocorrência da ovulação após 70% do período de estro, pode-se estimar, para efeito de discussão, que a ovulação ocorreu em média 48,2 horas após o início do estro, variando de 33,6 horas a 67,2 horas no conjunto das porcas. A análise da frequência de distribuição da duração do estro (Figura 1) evidenciou que 82% das porcas ovularam antes de 72 horas (3 dias); portanto, esse alto percentual de animais pode ter ovulado antes de 50,4 horas (70% da duração do estro).

Apesar do estabelecimento prévio de uma faixa de variação no intervalo desmama - estro para a inclusão das fêmeas no experimento, houve grande uniformidade das fêmeas quanto ao IDC (intervalo desmame-estro), provavelmente em virtude da grande similaridade dos animais dentro de genótipo, ordem de parto e duração da lactação das fêmeas do rebanho experimental (Figura 2).

Tabela 3 - Parâmetros reprodutivos das porcas utilizadas no experimento

Parâmetro	Número	Média	Desvio-padrão	Máximo	Mínimo
Ordem de parto (partos)	50	4,02	0,89	5	3
Duração da lactação (dias)	50	23,76	3,79	33	15
Intervalo desmama-estro (dias)	50	4,06	0,21	5	4
Duração do estro (dias)	50	2,87	0,52	4	2

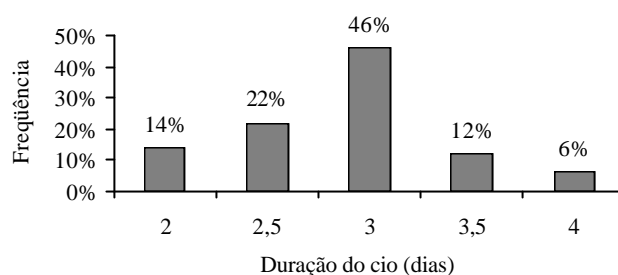


Figura 1 - Frequência de distribuição da duração do estro (n=50).

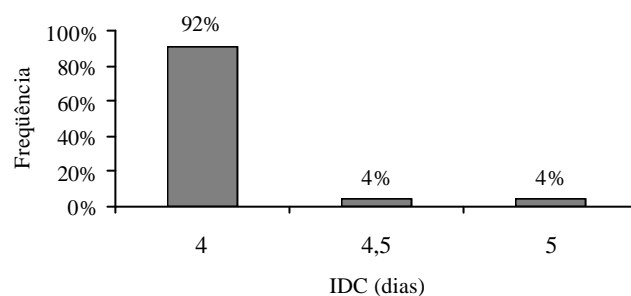


Figura 2 - Distribuição da variação do intervalo desmama - estro (n=50).

Apesar dos relatos (Weitze et al., 1994; Nissen et al., 1997; Correa et al., 1997) de influência do IDC na duração do estro, neste estudo, esta influência foi muito baixa (2,5%), provavelmente em razão do pequeno número de fêmeas analisadas (n = 50) e por terem sido incluídas somente fêmeas de ordem de parto entre 3 e 5, com IDC de 3 a 5 dias. As variações na duração do estro (Figura 1) podem ser atribuídas a fatores específicos de rebanho e da porca em particular (Belstra et al., 2004).

A análise das médias de nascidos por fêmea (Tabela 4) entre o parto anterior, no qual se utilizou o protocolo de rotina da granja, com três inseminações, e do parto subsequente, resultante da aplicação dos tratamentos (duas inseminações), comprovou aumento do número médio de animais nascidos de 13,77 para 14,96, portanto, a diminuição

Tabela 4 - Número médio de nascidos no parto anterior dentro da rotina da granja (com três inseminações) e no parto subsequente no grupo experimental

Inseminação	N	Média de nascidos	Máximo	Mínimo
3 (12, 24, 36 h)	50	13,60a ± 3,75	22	5
2 (12, 36 h)	50	14,94a ± 3,74	23	6

Médias (X± DP) com as mesmas letras na coluna não diferem entre si (P>0,05).

Dados relativos às mesmas fêmeas no parto anterior e no parto subsequente.

N = número.

no número de doses de sêmen utilizadas por estro não afetou negativamente o número de nascidos por parto.

Silveira et al. (2005), em estudo de campo com 362 porcas, compararam os mesmos protocolos de inseminação artificial e confirmaram a similaridade de desempenho reprodutivo em taxa de partos e número de leitões nascidos.

Neste estudo, não foi encontrada diferença (P>0,05) entre as médias do número médio de animais nascidos entre os tratamentos (Tabela 5). Não houve diferença (P<0,05) entre as médias de animais nascidos por tratamento (Tabela 4), o que comprova um desempenho padrão entre os tratamentos quanto ao número de nascidos e descarta prováveis interferências na fertilidade dos machos ou interações entre as doses de sêmen nos tratamentos com inseminações heterospérmicas.

Por meio da análise dos contrastes mutuamente ortogonais (alfa = 0,05), não foi detectada diferença (P>0,05) na média de nascidos por tratamento, portanto, o número de animais nascidos por tratamento não foi influenciado pelas fêmeas nem pelos tratamentos. Quando analisados os contrastes, não foram detectadas diferenças significativas entre a fertilidade dos machos. Neste tipo de experimento, é fundamental o uso de cachacos com o mesmo potencial de fertilidade. No tratamento 5, no qual foi misturado o sêmen dos dois machos (heterospermia) nas duas inseminações, confirmou-se esta informação pela similar distribuição de filhos de cada macho (Tabela 5).

Das 50 leitegadas obtidas com a aplicação dos tratamentos, foram submetidos à identificação todos os animais dos tratamentos 3, 4 e 5. Dos tratamentos 1 e 2, foi submetida à identificação uma leitegada completa (escolhidas por sorteio) de cada um para a validação da técnica, totalizando 453 animais. A comparação dos tamanhos dos fragmentos amplificados na PCR para os marcadores S0082 e S0097 possibilitou a identificação de 442 animais. Cinco animais não puderam ser identificados pela amplificação destes microssatélites e outros seis apresentaram genótipo distinto dos possíveis genótipos para os filhos dos

Tabela 5 - Média de nascidos totais por tratamento em inseminações duplas com um único doador, com alternância entre dois doadores e inseminações heterospérmicas

Tratamento	N	Média de animais nascidos	Desvio-padrão	Máximo	Mínimo
1	10	16,3a	±2,58	19	10
2	10	14,9a	±3,85	20	6
3	10	13,2a	±3,84	19	8
4	10	15,0a	±4,37	21	7
5	10	15,3a	±3,91	23	10

Médias com as mesmas letras na coluna não diferem entre si ( $\alpha = 0,05$ ).

1 e 2 - Inseminação homospérmica com o macho A e B respectivamente, 3 e 4 - Primeira inseminação com macho A e a segunda com o macho B e vice-versa. V - Inseminação com *pool* de sêmen dos dois machos.

N = número.

genitores em questão. A análise de microssatélites comprovou ser uma metodologia prática e bastante precisa para identificação individual de suínos e pode ser utilizada em qualquer experimento que necessite da identificação individual dos animais.

Dos 442 animais identificados, 268 foram produto da aplicação dos tratamentos 3 e 4 (131 filhos do macho A e 137 do macho B); 151 foram resultantes do tratamento 5 (75 filhos do macho A e 76 do macho B); 14 animais foram produto de inseminações homospérmicas com o sêmen do macho A e 9 do macho B. Esses números não diferiram (P>0,05) pela análise de variância e pelo teste T (Tabela 6) e revelam que não houve diferenças na fertilidade dos machos, uma vez que a produção de leitões foi semelhante (P>0,05), independentemente da ordem de aplicação das doses, mesmo quando se utilizou o *pool* de sêmen. Segundo Dziuk (1996) e Stalberg (1996), a inseminação com *pool* de sêmen é uma técnica altamente eficaz para detectar diferenças na fertilidade dos machos, fato que poderia interferir nos resultados deste trabalho, favorecendo um ou outro tratamento. No tratamento 5 (n = 151), no qual se utilizou um *pool* de sêmen dos dois machos, o macho A produziu 75 filhos e o macho B, 76 filhos (Tabela 6).

Na análise de paternidade dos leitões nascidos nos tratamentos 3 e 4, a primeira inseminação produziu 89 leitões (34,8%) e a segunda 167 leitões (65,23%) do total de 256 animais analisados (Tabela 6). Na análise da influência de cada dose de sêmen na composição das leitegadas, a segunda dose de sêmen contribuiu com a maioria dos animais nascidos (65,2% dos leitões gerados nos tratamentos 3 e 4), enquanto a primeira contribuiu com 34,8% dos nascidos (Tabela 7). Essa observação pode ser explicada pelo fato de que, na espécie suína, a ovulação ocorre no terço final do estro (Soede & Kemp, 1996; Steverink, 1997; Viana, 2001), de modo que o melhor momento para a reali-

Tabela 6 - Distribuição dos nascidos por cachaço doador e tratamento, de acordo com o genótipo encontrado na análise dos microssatélites

		Macho A	Macho B	Total	Não-identificados	Genótipo diferente do esperado	Total
Tratamentos 3 e 4	Nº de leitões	131a	137a	268	5	6	279
	Frequência (%)	47a	49a	96	2	2	100
Tratamento 5	Nº de leitões	76a	75a	151	0	0	151
	Frequência (%)	50a	50a	100	0	0	100
Total		207a	212a	419	5	65	

Números com mesma letra na mesma linha não diferem estatisticamente ( $\alpha = 0,5$ )

3 e 4 - Primeira inseminação com macho A e segunda com o macho B e vice-versa. V - Inseminação com *pool* de sêmen dos dois machos.

Tabela 7 - Número de nascidos viáveis para cada dose inseminante nos tratamentos com alternância de machos entre a 1ª e 2ª inseminação (tratamentos 3 e 4)

Tratamento	Primeira inseminação		Segunda inseminação	
	Nascidos	Frequência	Nascidos	Frequência
3	46b	35,6%	83a	64,34%
4	43b	33,8%	84a	66,14%
3 + 4	89b	34,8%	167a	65,2%

Tratamentos 3 e 4 -primeira inseminação com macho A e a segunda com o macho B e vice-versa.

Números com mesma letra na mesma linha não diferem entre si ( $\alpha = 0,05$ ).

zação das inseminações é o período entre 24 horas antes e até 4 horas após a ovulação (Soede & Kemp, 1997; Steverink et al., 1997; Viana, 2001). Assim, pode-se supor que, no momento da ovulação, o número de espermatozoides capazes de fertilização, infundidos na 1ª inseminação (12 horas após o início do TPL), foi menor que o número de espermatozoides da 2ª inseminação (36 horas após o início do TPL), pois, segundo Hunter (1982) e Hafez (1993), a vida média dos espermatozoides é de aproximadamente 24 horas na inseminação artificial e pode chegar a 36 horas (Steverink et al., 1997), considerando que a perda de capacidade fertilizante é um fenômeno gradativo (Hafez, 1993).

Na frequência de animais nascidos em cada parto, de cada inseminação (Figura 3), observou-se que, em 80% das leitegadas, houve animais resultantes de ambas as inseminações e que somente 20% das leitegadas eram compostas por animais nascidos de somente uma das inseminações.

Em análise intraleitegada, constatou-se que, na maior parte delas (85%), a maioria ( $\geq 51\%$ ) ou todos os leitões (100%) foram provenientes da 2ª inseminação e que somente em 15% das leitegadas a maioria ou todos os animais originaram-se da 1ª inseminação (dados não apresentados), o que demonstra que, no momento da ovulação, no reservatório espermático da junção útero-tubárica, havia espermatozoides das duas inseminações com capacidade de fertilizar os ovócitos, porém, a maioria destes espermatozoides era proveniente da segunda inseminação. Nas leitegadas com filhos somente da primeira inseminação,

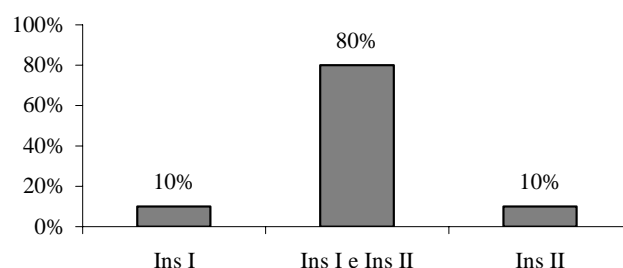


Figura 3 - Frequência de leitegadas com animais somente da 1ª inseminação, somente da 2ª inseminação e de ambas as inseminações.

a ovulação provavelmente ocorreu no início do estro (fêmeas ovuladoras precoces). Essas ovulações, segundo Vesseur et al. (1996), citado por Castagna (2001) e Weitze & Waberski (1994), podem ocorrer em até 10% das fêmeas do rebanho. Falhas no diagnóstico do real início do estro, provocando diagnósticos atrasados, também poderiam explicar esse fato.

No entanto, nos 10% de leitegadas com produtos somente da segunda inseminação, a ovulação ocorreu provavelmente no fim ou após o final do estro: ovuladoras tardias, 10 a 12% das fêmeas do rebanho, segundo Weitze & Waberski (1994), Viana (2001) e Castagna et al. (2001).

Os dados percentuais apresentados (Figura 3) diferem dos obtidos por Vesseur et al. (1996), que obtiveram taxas de 34, 26 e 40% para leitegadas com nascidos somente da 1ª dose inseminante, somente da 2ª dose inseminante e de ambas as doses, respectivamente, para fêmeas da mesma ordem de parto, entre 3 e 5. Diferem também dos dados desses autores para fêmeas com IDC de 4 dias, ou seja, 90% das fêmeas deste experimento. Para esta categoria de IDC, Vesseur et al. (1996) encontraram 24% das leitegadas com leitões exclusivamente da 1ª dose inseminante, 36% das leitegadas com leitões exclusivamente da 2ª dose inseminante e 40% das leitegadas com filhos de ambas as doses. Essas diferenças entre estudos quanto à duração média do estro e quanto ao intervalo estro-ovulação podem ser atribuídas a vários fatores. Segundo dados de Belstra et al. (2004), destacam-se a estação do ano, o genótipo utilizado, a

duração da lactação, além de outros fatores específicos de cada rebanho. O intervalo desmama-estro e a ordem de parto nos dois estudos foram similares.

Com o aumento na duração do estro entre 2 e 3 dias, houve também aumento no número médio de nascidos da 2ª inseminação em relação aos da 1ª inseminação, quando tendeu a se estabilizar (Figura 4). Os resultados obtidos por Soede et al. (1994), Weitze et al. (1994), Soede et al. (1995), Soede & Kemp (1997) e Borchardt Neto (1998), que definiram intervalos de viabilidade de sêmen e ovócitos e a dinâmica da ovulação, explicam a relação entre a duração do estro e a curva de nascidos. Esses resultados implicam que, desde que o esquema de inseminação seja mantido constante e que ocorram pelo menos duas inseminações espaçadas em 24 horas durante o estro, uma delas ocorrerá próximo à ovulação na maioria das porcas, o que possibilitará excelente desempenho reprodutivo. A segunda dose de sêmen contribuiu com a maioria dos animais nascidos (65,23%) na maioria das leitegadas obtidas no trabalho (75%). Entretanto, apesar da menor contribuição da primeira dose, a segunda dose não pode ser descartada, pois contribuiu com 34,76% dos animais nascidos; teve a maior contribuição em 15% das leitegadas; e em 10% das leitegadas teve igual contribuição em comparação à segunda dose.

Com base nos resultados descritos por Belstra et al. (2004), é possível afirmar que os fatores que afetam o intervalo início do estro - ovulação geralmente afetam a porcentagem de casos (com dupla inseminação) nos quais uma inseminação artificial em particular será mais sincronizada com o momento da ovulação que a outra. De qualquer modo, uma destas inseminações ocorrerá suficientemente próximo à ovulação para garantir consistência nos resultados reprodutivos.

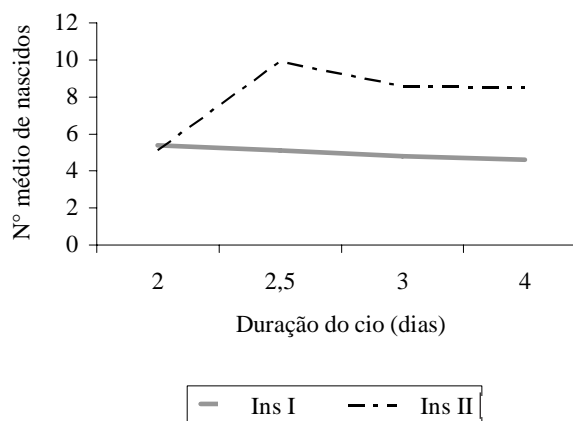


Figura 4 - Número médio de nascidos da 1ª e 2ª inseminações em relação à duração do estro.

## Conclusões

Nas condições de manejo, linhagem genética e protocolo de inseminação artificial utilizados no experimento, conclui-se que a 1ª e a 2ª doses inseminantes contribuem conjuntamente para a formação das leitegadas, mesmo com intervalo de 24 horas entre elas. Por estar presente na composição de 90% das leitegadas, a primeira dose inseminante mantém contribuição essencial para a maximização da prolificidade e da taxa de parição. Independentemente da magnitude da variação no horário de ocorrência da ovulação na fêmea suína, um protocolo simples de duas inseminações artificiais com intervalo de 24 horas é suficiente para otimizar o desempenho reprodutivo.

## Literatura Citada

- AFONSO, J.B.A.; LUCIA, T.J.R.; CORREA, M.N. et al. Efeito da frequência de inseminações artificiais por cio sobre o desempenho reprodutivo de porcas desmamadas precocemente. In: CONGRESSO DA ABRAVES, 10., 2001, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, 2001. p.267-268.
- BELSTRA, B.A; FLOWERS, W.L.; SEE, M.T. Factors affecting temporal relationships between estrus and ovulation in commercial sow farms. **Animal Reproduction Science**, v.84, n.3-4, p.377-394, 2004.
- BORCHARDT NETO, G. **Causes of variation of oestrus length and onset of oestrus to ovulation interval and their relationship with pregnancy rate and litter size in multiparous sows**. Hannover: Tierärztliche Hochschule Hannover, 1998. Thesis (Doctor in Veterinary) - Tierärztliche Hochschule Hannover, 1998.
- CASTAGNA, C.O.; PEIXOTO, C.H.; MARCHETTI, A.N. et al. **Influência do intervalo desmame estro na duração do estro e no momento da ovulação em dois rebanhos suínos**. In: In: CONGRESSO DA ABRAVES, 10., 2001, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, 2001. p.263-264.
- CASTAGNA, C.D.; BORTOIOZO, F.P.; WENTZ, I. Estratégias de inseminação artificial na suinocultura moderna. In: CONGRESSO DA ABRAVES, 10., 2001, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, 2001. p.143-150.
- CORREA, M.N.; MENIKE, W.; LUCIA JR., T. et al. **Inseminação artificial em suínos**. Pelotas: Editora UFPEL, 2001. 181p.
- DZIUK, P.J. Factors that influence the proportion of offspring sired by a male following heterospermic insemination. **Animal Reproduction Science**, v.43, p.65-88, 1996.
- ELLEGREN, H.; JOHANSSON, M.; CHOWDHARY, B.P. et al. Assignment of 20 microsatellite markers to the porcine linkage map. **Genomics**, v.16, p.431-439, 1993.
- HAFEZ, E.S.E **Transport and survival of gametes. Reproduction in farm animals**. 6.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p.144-164.
- HUNTER, R.H.F. **Interrelationships between spermatozoa, the female reproductive tract, and the egg investments**. In: COLE, D.J.A; FOXCROFT, G.R. (Eds.) Control of pig reproduction. Butterworths: 1982. p.49-63.
- JOHANSSON, M.; ELLEGREN, H.; ANDERSSON, L. Cloning and characterization of highly polymorphic porcine microsatellites. **Journal of Heredity**, n.83, p.196-198, 1992.

- KEMP, B.; SOEDE, N.M. Time of insemination relative to ovulation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.52, p.79-89, 1997 (suppl.).
- LOOFT, C.; NAGEL, M.; CHARDON, P. et al. Dinucleotide repeat polymorphism at the porcine tfa locus. **Animal Genetics**, n.26, p.366-367, 1995.
- NISSEN, A.K.; SOEDE, N.M.; HZTTEL, P. et al. The influence of time of insemination relative to time of ovulation on farrowing frequency and litter size in sows, as investigated by ultrasonography. **Theriogenology**, v.47, p.1571-1582, 1997.
- REGINATO, L.C.A.; COUTINHO, L.L. **Biologia molecular aplicada à produção animal**. Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2001. p.215.
- STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM - SAS. **System for Microsoft Windows**. Release 8.01. Cary: 2001. (CD-ROM).
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. Preparation and analysis of eukaryotic genomic DNA. In: SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. (Eds.) **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3.ed. New York: Cold Spring Harbor, 2001. v.1, p.6.4-6.62.
- SILVEIRA, P.R.S.; ZANELLA, E.L.; FLORES, P.R.S. et al. Eficiência de protocolos de inseminação artificial de porcas com duas *versus* três doses durante o mesmo estro. In: CONGRESSO DA ABRAVES, 12., 2005, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, 2005. p.297-298.
- SOEDE, N.M.; KEMP, B. Oestrus expression and timing of ovulation in pigs. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.52 p.79-89, 1997 (suppl.).
- SOEDE, N.M.; WETZELS, C.C.H.; ZONDAG, W. et al. Effects of time of insemination relative to ovulation, as determined by ultrasonography, on fertilization rate and accessory sperm count in sows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.104, p.99-106, 1995.
- SOEDE, N.M.; HZELEGER, W.; BROOS, J. et al. Vaginal temperature is not related to the time of ovulation in sows. **Journal of Animal Reproduction Science**, v.47, p.245-252, 1997.
- STAHLBERG, R. **Vaterschaftsnachweis an embryonen mit polymorphen DNA-Markern zur Fertilitätsbeurteilung von Ebern nach heterospemer Insemination**. Hanover: Tierärztliche Hochschule Hannover, 1996. 95p. Tese (Doctor in Veterinary) - Tierärztliche Hochschule Hannover, 1996.
- STAHLBERG, R.; HARLIZIUS, B.; WEITZE, K.F. et al. Identification of embryo paternity using polymorphic DNA marks to assess fertilizing capacity of spermatozoa after heterospermic insemination in boars. **Theriogenology**, v.53, p.1365-1373, 2000.
- STEVERINK, D.W.B.; SOEDE, N.M.; BOUWMANN, E.G. et al. Influence of insemination-ovulation interval and sperm cell dose on fertilization in sows. **Journal of Reproduction and Fertility**, n.111, p.165-171, 1997.
- STEVERINK, D. **Optimizing insemination strategies in pigs**. Wageningen: Wageningen University, 1999. 174p. Thesis (Doctor in Veterinary) - Wageningen University, 1999.
- TILTON, J.E.; COLE, D.J.A. Effect of triple versus double mating on sow productivity. **Animal Productivity**, v.34, p.279-282, 1982.
- VESSEUR, P.C.; KEMP, B.; den HARTOG, L.A. Factors influencing the proportion of offspring from a second insemination in sows. **Animal Reproduction Science**, v.41, p.255-265, 1996.
- VIANA, C.H.C. **Avaliação dos intervalos inseminação-ovulação e desmame-cio e da duração do cio como parâmetros na determinação de programas alternativos de inseminação artificial em suínos**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2001. 76p. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Universidade de São Paulo, 2001.
- WEITZE, K.F.; WABERSKI, D. Artificial insemination in pig farms. **Reproduction in Domestic Animal**, v.59, n.5, p.374-375, 1994.
- WEITZE, K.F.; WAGNER-RIETSCHER, H.; WABERSKI, D. et al. The onset of heat after weaning, heat duration, and ovulation as major factors in AI timing in sows. **Reproduction in Domestic Animal**, v.29, n.7, p.433-443, 1994.
- XUE, J.; DIAL, G.D.; TRIGG, T. et al. Influence of mating frequency on sow reproductive performance. **Journal of Animal Science**, v.76, p.2962-2966, 1998.