

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

**Contribuição de machos suínos para paternidade de  
leitões gerados por inseminação artificial  
heterospérmica**

**Carlos Eduardo Ranquetat Ferreira**

Pelotas/RS, 2013

**CARLOS EDUARDO RANQUETAT FERREIRA**

**CONTRIBUIÇÃO DE MACHOS SUÍNOS PARA PATERNIDADE DE LEITÕES  
GERADOS POR INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL HETEROSPÉRMICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do conhecimento: Reprodução Animal).

Orientador: Thomaz Lucia Jr

Co-Orientadores: Carine Dahl Corcini, Dra. UFPel  
Ivan Bianchi, Dr. UFPel

Pelotas/ RS, 2013.

**Dados de catalogação na fonte:**  
(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

F383c Ferreira, Carlos Eduardo Ranquetat

Contribuição de machos suínos para paternidade de leitões gerados por inseminação artificial heterospérmica / Carlos Eduardo Ranquetat Ferreira; orientador Thomaz Lucia Jr; co-orientadores Carine Dahl Corcini e Ivan Bianchini - Pelotas, 2013. -39f. : il. - Dissertação ( Mestrado) –Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Faculdade de Veterinária . Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2013.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Thomaz Lucia Jr, PhD, UFPel (orientador)

Prof. Fernando Pandolfo Bortolozzo, PhD, UFRGS

Prof. Odir Antônio Dellagostin, PhD, UFPel

Dra. Fabiana Moreira, UFPel

## **AGRADECIMENTOS**

A meus pais Carlos Nunes Ferreira e Ayeza Maria Ranquetat Ferreira pelo apoio e tempo dispensados em minha educação e formação, por acreditarem em meus objetivos fornecendo o suporte necessário para as realizações.

A minha noiva Débora de Moura Ponsati pelos anos de convivência e crescimento como pessoas. Por compartilhar sua vida comigo, onde através do amor caminhamos juntos em busca da felicidade e de nossos sonhos. A minha sogra Dolores de Moura Ponsati pela torcida e apoio dispensados, sempre com palavras positivas de estímulo para seguir em frente, a estas pessoas dedico minha dissertação.

Ao meu orientador Thomaz Lucia Jr. pelas oportunidades até aqui proporcionadas, que me fizeram evoluir pessoal e profissionalmente. Pelos conhecimentos adquiridos durante os momentos convivência no laboratório e durante o futebol semanal.

A minha co-orientadora Carine Dahl Corcini pelo exemplo como profissional, sempre desempenhando suas atividades com o máximo empenho e dedicação exigindo sempre o máximo de cada um. Por confiar no trabalho realizado e sempre oportunizar o conhecimento. Pela grande amizade conquistada juntamente ao seu marido Antônio Sérgio Varela Jr. e pelos ótimos momentos de convivência. Aos professores Arnaldo Vieira, Rafael Mondadori e Ivan Bianchi pela amizade orientação e convivência.

Aos meus colegas da pós-graduação por dividirmos o conhecimento e responsabilidades no laboratório que nos fazem evoluir, em especial a Daniel Borges Sávio, Gustavo Gastal e Alexander Gonçalves pelo suporte, companheirismo e amizade durante a realização do experimento. Aos estagiários e ao Sr. Paulo do grupo ReproPel pela alegria, descontração e disponibilidade na realização das atividades permitindo que nosso grupo cresça.

Ao senhor Nelso Pasqual e a todos os colaboradores da Granja São Roque que auxiliaram sempre com muito empenho e presteza durante os trabalhos, em especial ao casal Fátima e Valdir Bridi pela grande amizade.

Por fim, meu maior agradecimento a Deus pelo “dom da vida” que nos permite pensar, sonhar, acertar, errar, refletir, amar...

## RESUMO

FERREIRA, Carlos Eduardo Ranquetat. **Contribuição de machos suínos para paternidade de leitões gerados por inseminação artificial heterospérmica** 2013 39 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas.

O uso generalizado de *pool* de sêmen (dois ou mais machos compondo a dose) em inseminações artificiais comerciais limita a análise dos dados de fertilidade dos reprodutores. Pequenas diferenças no potencial fecundante dos machos doadores são ocultadas pelo uso de doses heterospérmicas. Este trabalho teve por objetivo identificar a contribuição individual de reprodutores suínos para a composição da progênie gerada por inseminação artificial heterospérmica. Foram utilizados quatro reprodutores suínos. Após a coleta dos ejaculados foram elaboradas doses inseminantes (DI) homospérmicas (A, B, C e D) e DI heterospérmicas, formando os *pools* (AB, AC, AD, BC, BD e CD) contendo  $3,0 \times 10^9$  espermatozoides em 80 ml. Foram inseminadas 511 fêmeas. A determinação da paternidade foi através de marcadores SNP (*Single nucleotide polymorphism*). Foram genotipadas amostras de um total de 4.019 leitões, 3.558 provenientes de IA heterospérmicas e 461 provenientes de IA homospérmicas. Durante a análise do percentual de paternidade por *pool*, constatou-se que AC foi o único grupo em cada macho contribuiu igualmente para o tamanho das leitegadas ( $P > 0,05$ ), nos demais *pools* foi observada diferença estatística significativa ( $P < 0,05$ ). A avaliação das doses heterospérmicas revelou que as médias mais elevadas foram de *pools* formados pelo reprodutor D, que contribuiu com aproximadamente 60% do total de nascidos (TN) em seus *pools*. Conforme os resultados obtidos, na maioria dos casos estudados não há contribuição semelhante na quantidade de leitões nascidos, ainda que a concentração de células espermáticas de cada um dos machos seja idêntica na formação das DIs.

Palavras chave: Marcadores moleculares. SNP. Desempenho reprodutivo.

## ABSTRACT

FERREIRA, Carlos Eduardo Ranquetat. **CONTRIBUTION OF BOARS FOR THE PARENTHOOD OF PIGLETS SIRED THROUGH HETEROSPERMIC ARTIFICIAL INSEMINATION** 2013 39 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas.

The common use of pooled sperm doses (composed of sperm of two or more boars) in artificial insemination (AI) in swine limits the precise evaluation of individual boar fertility. Thus, marginal differences in potential fertility among boars are clouded by the use of heterospermic AI. This study had the objective of identifying the contribution of individual boars for the paternity of progeny generated by heterospermic AI. Four boars were used as sperm donors (A, B, C and D). After collection, ejaculates from those boars were used to compose homospermic and heterospermic doses (AB, AC, AD, BC, BD and CD), all including  $3.0 \times 10^9$  spermatozoa in 80 ml. A total of 511 females were inseminated. The paternity of 4.119 piglets was determined through the use of SNP (*Single nucleotide polymorphism*) markers : 3.558 from heterospermic AI; and 461 from homospermic AI. The comparison of paternity per pool showed that the pool AC was the only one in which each boar contributed similarly for paternity ( $P > 0.05$ ), whereas differences between boars occurred in all other pools ( $P < 0.05$ ). The greatest contribution for paternity of piglets occurred for boar D, which sired nearly 60% of all piglets boar in the pools in which that boar took part. These results indicate that in most of the heterospermic AI, individual boars contribute distinctly for the paternity of the piglets, even though each boar contributes with the same sperm concentration in the pooled sperm doses.

Key words: Molecular markers. SNP. Reproductive performance.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Total de nascidos por leitegada com IA homospérmica (machos A, B, C e D) ou heterospérmica (pools AB, AC, AD, BC, BD e CD).....	33
----------	---	----

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Painel de marcadores SNP para paternidade em suínos SeekSire® .....	34
Tabela 2	Número total de leitões nascidos por dose inseminante ( <i>pool</i> ) e por macho após inseminação artificial heterospérmica.....	35
Tabela 3	Número total de leitões gerados com inseminação artificial (IA) com doses homospérmicas e heterospérmicas por macho....	36
Tabela 4	Percentual de paternidade por macho em leitegadas com diferente número total de leitões nascidos após inseminação artificial com doses heterospérmicas.....	37
Tabela 5	Percentual de paternidade por dose inseminante após inseminação artificial com doses heterospérmicas.....	38

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

CCPS - Central de coleta e processamento de sêmen

DI - Dose inseminante

DNA - Ácido desoxirribonucléico

IA - Inseminação artificial

IA Homospérmica - Inseminação artificial homospérmica

IA Heterospérmica - Inseminação artificial heterospérmica

IAIC - Inseminação artificial intra cervical

OP - Ordem de parto

TN - Total de leitões nascidos por parto

TP - Taxa de parição

SNP - Polimorfismo de um único nucleotídeo

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL .....	12
2. OBJETIVOS.....	14
Objetivo geral .....	14
Objetivos específicos .....	14
3. ARTIGO Contribuição de machos suínos para paternidade de leitões gerados por inseminação artificial heterospérmica.....	15
3.1 RESUMO .....	16
3.2 INTRODUÇÃO .....	18
3.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.3.1 Seleção dos reprodutores e coletas de sêmen .....	19
3.3.2 Preparo das doses inseminantes (DI).....	20
3.3.3 Seleção das fêmeas e inseminação artificial .....	20
3.3.4 Acompanhamento dos partos e coleta de material genético .....	21
3.3.5 Extração de DNA, genotipagem e exclusão da paternidade.....	21
3.3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	22
3.4 RESULTADOS.....	23
3.5 DISCUSSÃO .....	25
3.6 CONCLUSÃO .....	28
3.7 REFERÊNCIAS.....	29
3.8 ANEXOS .....	33

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil possui um rebanho total de 39 milhões de cabeças de suínos (ABCS, 2011). Em 2010, foram abatidos 32,5 milhões de suínos, o que classifica o país como o quarto maior produtor mundial de carne suína, com um total de 3,3 milhões de toneladas produzidas, atrás apenas da China, União Europeia e Estados Unidos. Com a valorização do Real frente ao Dólar, nos últimos anos, houve um fortalecimento do mercado interno e um aumento no consumo per capita de carne suína, que passou de 13,4 para 15,1 kg (ABIPECS, 2012). Dentro de uma indústria altamente competitiva, tecnologias como a inseminação artificial (IA), são incorporadas constantemente, visando o incremento da eficiência do sistema de produção (FOXCROFT et al., 2008).

A IA apresenta algumas vantagens como: a prevenção da disseminação de doenças sexualmente transmissíveis; o melhor aproveitamento dos reprodutores alojados; redução com custos de cobertura; evolução técnica da equipe (BORTOLOZZO et al., 2005); e a rápida e eficiente distribuição da genética de alta qualidade (TURBA et al., 2007; MAES et al., 2011).

Em suínos, a IA é tradicionalmente realizada pelo método intracervical (IAIC), com a deposição de  $2,5$  a  $4 \times 10^9$  espermatozoides no canal cervical da fêmea, através de uma pipeta, em duas a três doses inseminantes (DI) com 70-100 ml por estro (WATSON & BEHAN, 2002). Estas condições limitam o número de doses que podem ser preparadas a partir de um ejaculado para aproximadamente 20-25 doses (MARTINEZ et al., 2005), restringindo a eficiência econômica desta técnica para a indústria, pois reprodutores de elevado mérito genético tem seu uso limitado pelo número de espermatozoides por DI (ROCA et al., 2011).

Grande parte das DIs produzidas são heterospérmicas (*pools*), ou seja, produzidas a partir do sêmen de dois ou mais reprodutores. A utilização de DI heterospérmicas seria justificada pela diluição dos efeitos individuais de cada reprodutor, do inseminador ou do ambiente (STAHLBERG et al., 2000), além de compensar diferenças de fertilidade entre os reprodutores (DZIUK, 1996). No entanto, a utilização de doses heterospérmicas apresenta limitações, pois pequenas diferenças no potencial fecundante dos doadores de sêmen são

mascaradas (DICK et al., 2011). O uso de DI heterospérmicas também compromete a avaliação da fertilidade individual de cada reprodutor (FOXCROFT et al., 2010a), devido a dificuldade de associar a progênie ao pai (NOVAK et al., 2008), o que só pode ser realizado através de marcadores moleculares.

Atualmente, dois marcadores moleculares genéticos são mais utilizados para a identificação individual e de paternidade: os marcadores microssatélites que se apresentam aleatoriamente a cada 46 kb no genoma dos suínos; e os polimorfismos de um único nucleotídeo (*Single nucleotide polymorphism* – SNP), que se apresentam amplamente distribuídos no genoma. A densidade dos SNPs no genoma suíno é quatro vezes maior do que em seres humanos. Nos suínos, são encontrados SNPs a cada 300 a 400 pb, enquanto que, em humanos, a densidade dos SNPs é estimada em um a cada 1000-2000 pb (KERSTENS et al., 2009).

Conforme sugerido pela sigla, um marcador SNP é caracterizado por uma simples mudança de base nitrogenada em uma sequência de DNA, representando uma troca entre dois nucleotídeos possíveis em uma determinada posição (VIGNAL et al., 2002). Os SNPs são polimorfismos na sequência de DNA, que ocorrem com elevada frequência nas populações, sendo o tipo mais frequente de mutações no genoma de mamíferos (NEGRINI et al., 2008).

Este trabalho teve por objetivo avaliar a contribuição individual de reprodutores suínos usados como doadores de sêmen para DI heterospérmicas, para a composição da progênie gerada por IA.

## **2. OBJETIVOS**

### **Objetivo geral**

- Caracterizar a contribuição individual de cada reprodutor suíno para a composição da progênie gerada por inseminação artificial heterospérmica através de teste de paternidade utilizando marcadores SNPs.

### **Objetivos específicos**

- Comparar a produção de leitões gerada por machos suínos usados como doadores de sêmen em inseminações artificiais homospérmicas e heterospérmicas;
- Avaliar a eficiência da determinação de paternidade por SNPs após o uso de doses inseminantes heterospérmicas na inseminação artificial em suínos.

**3. ARTIGO Contribuição de machos suínos para paternidade de leitões gerados por inseminação artificial heterospérmica**

Formatado segundo as normas da revista Ciência Rural

## CONTRIBUIÇÃO DE MACHOS SUÍNOS PARA PATERNIDADE DE LEITÕES GERADOS POR INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL HETEROSPÉRMICA

### CONTRIBUTION OF BOARS FOR THE PARENTHOOD OF PIGLETS SIRED THROUGH HETEROSPERMIC ARTIFICIAL INSEMINATION

FERREIRA, C.E.R.; SÁVIO, D.B.; GUARISE A.C.; FLACH M.J.; GASTAL, G.D.A.;  
GONÇALVES, A.O.; BIANCHI, I. ; CORCINI, C.D.; LUCIA, T. Jr

Repropel, Faculdade de Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS.

([c\\_ranquetat@hotmail.com](mailto:c_ranquetat@hotmail.com) - Fone: 053-9999-1509)

<http://www.ufpel.tche.br/fvet/repropelpigpel>

#### 3.1 RESUMO

O uso generalizado de doses heterospérmicas (formada pelo sêmen de dois ou mais machos) em inseminações artificiais comerciais limita a análise dos dados de fertilidade dos reprodutores. Diferenças no potencial fecundante dos machos doadores são ocultadas pelo uso de *pool* de sêmen. Este trabalho teve por objetivo identificar a contribuição individual de reprodutores suínos para a composição da progênie gerada por inseminação artificial heterospérmica. Foram utilizados quatro reprodutores suínos. Após a coleta dos ejaculados eram elaboradas doses inseminantes (DI) homospérmicas (A, B, C e D) e DI heterospérmicas, formando os *pools* (AB, AC, AD, BC, BD e CD) contendo  $3,0 \times 10^9$  espermatozoides em 80 ml. Foram inseminadas 511 fêmeas com ordem de parto entre um e seis. A determinação da paternidade foi através de marcadores SNP (*Single nucleotide polymorphism*), foram genotipadas amostras de um total de 4.019 leitões, 3.558 provenientes de IA heterospérmicas e 461 provenientes de IA homospérmicas. Durante a análise do percentual de paternidade por *pool*, constatou-se que AC foi o único grupo em que cada macho contribuiu igualmente para o tamanho das leitegadas, nos demais *pools* foi observada diferença estatística significativa ( $P < 0,05$ ). A avaliação das doses heterospérmicas revelou que as médias mais elevadas foram de *pools* formados pelo reprodutor D, que contribuiu com aproximadamente 60% do total de nascidos (TN) em seus *pools*. Conforme os

resultados obtidos, na maioria dos casos estudados não há contribuição semelhante na quantidade de leitões nascidos, ainda que o número de células espermáticas de cada um dos machos seja idêntico na formação das DIs.

Palavras chave: marcadores moleculares, SNP, desempenho reprodutivo.

**ABSTRACT:**

The common use of pooled sperm doses (composed of sperm of two or more boars) in swine artificial insemination (AI) limits the precise evaluation of individual boar fertility. Thus, marginal differences in potential fertility among boars are clouded by the use of heterospermic AI. This study had the objective of identifying the contribution of individual boars for the paternity of progeny generated by heterospermic AI. Four boars were used as sperm donors (A, B, C and D). After collection, ejaculates from those boars were used to compose homospermic and heterospermic doses (AB, AC, AD, BC, BD and CD), all including  $3.0 \times 10^9$  spermatozoa in 80 ml. A total of 511 females were inseminated. The paternity of 4.119 piglets was determined through the use of SNP markers: 3.558 from heterospermic AI; and 461 from homospermic AI. The comparison of paternity by pool found that the pool AC was the only one in which each boar contributed similarly for paternity ( $P > 0.05$ ), whereas differences between boars occurred in all other pools ( $P < 0.05$ ). The greatest contribution for paternity of piglets occurred for boar D, which sired nearly 60% of all piglets born in the pools in which that boar took part. These results indicate that in most of the heterospermic AI, individual boars contribute distinctly for the paternity of the piglets, even though each boar contributes with the same sperm concentration in the pooled sperm doses.

**KEY WORDS:** molecular markers, SNP, reproductive performance.

### 3.2 INTRODUÇÃO

Na inseminação artificial (IA) heterospérmica, uma fêmea recebe doses inseminantes (DI) compostas por sêmen de dois ou mais reprodutores, com cada doador de sêmen contribuindo com o mesmo número de espermatozoides para a composição da DI (STAHLBERG et al., 2000).

A IA heterospérmica é amplamente praticada na suinocultura, em função da possibilidade de diluir os efeitos individuais de cada reprodutor (DZIUK, 1996) ou de compensar diferenças no desempenho reprodutivo dos doadores (STAHLBERG et al., 2000). Em comparação com IA homospérmica, na qual a DI é composta pelo sêmen de apenas um reprodutor, a IA heterospérmica é considerada mais eficiente em termos de fertilidade, pois reduz alguns efeitos que podem ocorrer durante o processo de fecundação, tais como: a variação da fertilidade entre fêmeas; métodos de gestão na granja e habilidade do inseminador (STAHLBERG et al., 2000). Porém, o uso de IA heterospérmica apresenta algumas limitações. Uma limitação seria a dificuldade em aferir o potencial fertilizante de cada reprodutor, pelas técnicas rotineiramente empregadas na avaliação dos ejaculados nas centrais de IA (DYCK, 2011). Com a IA heterospérmica, a identificação da paternidade da progênie é difícil, exigindo o uso de testes moleculares (NOVAK et al., 2008)

Segundo Haugan et al., (2005) a utilização de DI heterospérmicas permite um incremento na produtividade, em comparação com o uso de DI homospérmicas. Porém, a utilização de DI heterospérmicas pode contribuir para a manutenção de machos com menor fertilidade nas centrais de IA, pois dificulta a avaliação das características reprodutivas individuais de cada reprodutor (FOXCROFT et al., 2008).

Os SNPs são um importante tipo de marcador molecular, pois se apresentam amplamente distribuídos no genoma, são relativamente estáveis de geração para geração, possuem maior facilidade no manuseio laboratorial e genotipagem compatível com a automação (GOFFAUX et al., 2005; GABRIEL et al., 2009; KERSTENS et al., 2009). São utilizados em diferentes aplicações como: rastreabilidade; estudos de estrutura populacional, e de genes (NEGRINI et al., 2008; SPÖTER et al., 2010; RAMOS et al., 2011; MATSUMOTO et al., 2012) além de exclusão de parentesco (ROHRER et al., 2007; HILL et al., 2008; HARLIZIUS et al., 2011).

Este trabalho teve os seguintes objetivos: determinar a contribuição específica de machos suínos usados como doadores de sêmen para a composição da progênie gerada por IA heterospérmica; avaliar o desempenho individual destes machos em comparação com o obtido com IA homospérmica; e; determinar paternidade individual de progênie gerada por IA heterospérmica através de marcadores SNPs.

### **3.3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.3.1 Seleção dos reprodutores e coletas de sêmen**

Durante o experimento, foram usados quatro reprodutores suínos Agroceres sexualmente maduros, com idade média de  $23,5 \pm 4,3$  meses. Os machos estavam alojados em uma Central de Coleta e Processamento de Sêmen localizada no município de Videira (latitude  $27^{\circ}00'30''$  sul, longitude  $51^{\circ}09'06''$  oeste), na região do meio oeste de Santa Catarina. Os machos foram alojados em pavilhão climatizado com temperatura mantida entre  $18 - 20^{\circ}\text{C}$  e mantidos em gaiolas individuais, alimentados com 2,0 a 2,5 kg de ração, duas vezes ao dia, de acordo com a sua condição corporal e fornecimento de água *ad libitum*.

Os machos estavam submetidos a um regime de coleta semanal de sêmen, durante 10 semanas, entre outubro e dezembro de 2010. As coletas de sêmen foram realizadas através de manequim automático AutoMate (Minitub® do Brasil, Porto Alegre, RS, Brasil). O intervalo médio entre cada coleta de sêmen foi de seis dias, sendo as coletas sempre conduzidas por funcionários treinados. A seleção dos reprodutores usados no experimento foi baseada no seu histórico de produção de doses de sêmen. Cada macho deveria produzir, em média, 33 doses/ejaculado/semana.

Os ejaculados foram armazenados em copos coletores pré-aquecidos a  $35^{\circ}\text{C}$ , revestidos com embalagem plástica descartável (Minitub® do Brasil, Porto Alegre, RS, Brasil) e filtrados com gaze para remoção da porção gelatinosa. Foram avaliados os seguintes padrões de qualidade seminal: volume (ml), através de pesagem em balança eletrônica do copo coletor contendo o ejaculado; concentração espermática (milhões de espermatozoides/ml) através da avaliação do número de espermatozoides realizada em câmara de Neubauer (CBRA, 1998); e motilidade e vigor espermático, avaliados em uma gota de sêmen colocada entre lâmina e lamínula aquecidas a  $37^{\circ}\text{C}$ , por microscopia ótica sob aumento de 200 x (CBRA,

1998). Todas estas avaliações foram realizadas pelo mesmo técnico treinado. Dos ejaculados coletados, somente aqueles que apresentaram motilidade igual ou superior a 70% e vigor igual ou superior a três foram processados para serem usados no experimento (CBRA, 1998), totalizando dez ejaculados processados por macho.

### **3.3.2 Preparo das doses inseminantes (DI)**

As DI foram diluídas com o diluente de longa duração Androstar (Minitub® do Brasil, Porto Alegre, RS, Brasil). As DI produzidas apresentavam concentração de  $3,0 \times 10^9$  espermatozoides totais e um volume de 80 ml. Após a diluição, a motilidade e o vigor foram reavaliados, como estratégia de controle do processo.

Cada um dos quatro machos foi identificado individualmente: A; B; C; e D. Para cada macho, DI homospérmicas foram identificadas da mesma forma. As DI heterospérmicas foram identificadas de acordo com o *pool* de dois machos que contribuíram para a sua composição: AB; AC; AD; BC; BD; e CD. Portanto, 10 grupos foram formados: quatro com DI homospérmicas; e seis com DI heterospérmicas. Nas DI heterospérmicas, cada macho apresentou a mesma contribuição, ou seja, 50% do número total de espermatozoides incluídos na DI, com o volume controlado através de proveta graduada.

As DI foram embaladas utilizando-se o sistema automático GTB 1000 (IMV® Brasil, São Paulo, SP, Brasil) em *blisters* identificados com o código do macho ou do *pool*, com a data do envase e tempo de uso da DI (cinco dias). Posteriormente, as DI foram armazenadas em caixas condicionadoras e enviadas a granja, tendo sido mantidas a temperatura entre 15-18°C, até o momento de sua utilização.

### **3.3.3 Seleção das fêmeas e inseminação artificial**

Foram inseminadas 511 fêmeas (aproximadamente 50 para cada grupo), com ordem de parto (OP) entre um e seis. As fêmeas foram alojadas em uma unidade produtora de leitões (UPL) localizada no mesmo município da CCPS.

As matrizes foram mantidas em gaiolas individuais após o desmame e submetidas à detecção de estro duas vezes ao dia (às 8 e às 15 h), depois do arraçoamento, na presença de um macho sexualmente maduro conduzido pelo corredor central da instalação, proporcionando um contato naso-nasal com as matrizes, enquanto dois funcionários observavam o reflexo de tolerância ao homem na presença do macho (RTHM). Após a detecção do estro, as fêmeas foram

distribuídas aleatoriamente entre os grupos, sendo identificadas (marcação com giz e na ficha individual), a fim de receberem o mesmo tratamento nas IA subsequentes.

As IA seguiram o protocolo rotineiramente usado pela granja, composto de três IA para fêmeas com OP 1 (12/24/36 h após a identificação de estro) e duas IA para fêmeas de OP 2 a 6 (12/36 h após a identificação de estro), com uma eventual IA às 60 h, no caso de RTHM positivo. As IA sempre foram realizadas na presença de macho sexualmente maduro. O diagnóstico de retorno ao estro foi realizado a partir de 16 dias após a IA, através do RTHM.

#### **3.3.4 Acompanhamento dos partos e coleta de material genético**

Durante os partos, foram realizados registros em fichas individuais do número total de leitões nascidos (TN), nascidos vivos, natimortos e mumificados por parto. A taxa de parição (TP) foi calculada para cada grupo (DIAL et al., 1992).

No momento do parto, foram colhidas amostras de sangue das mães (da veia marginal da orelha) e dos leitões nascidos vivos e natimortos (preferencialmente do cordão umbilical e, eventualmente, da veia marginal da orelha). Também foram colhidas amostras de esfregaços de tecidos dos leitões mumificados. Todas estas amostras foram usadas para a identificação da paternidade. No caso dos machos, foram usadas amostras de sangue ou sêmen colhidas anteriormente.

As amostras foram armazenadas em matrizes quimicamente tratadas Whatman FTA card<sup>®</sup> (BioAmerica Inc., EUA), destinadas à coleta, transporte, armazenagem e extração de ácidos nucléicos, permitindo que o DNA fosse imobilizado e conservado à temperatura ambiente por anos, podendo ser analisado tão rapidamente quando necessário (WHATMAN, 2012a).

#### **3.3.5 Extração de DNA, genotipagem e exclusão da paternidade**

Para a extração do DNA, foi retirado de cada cartão, com um instrumento de punção, um pequeno pedaço do filtro contendo a amostra de sangue ou tecido (de 1 a 3 mm), que foi colocado em um tubo de PCR. O pedaço do filtro foi lavado com Whatman FTA Reagente (BioAmerica Inc., EUA), por três vezes para eliminação dos inibidores. Mais duas lavagens foram feitas, com um tampão aquoso (EDTA), conforme descrito pelo fabricante (WHATMAN, 2012b). O DNA foi quantificado por espectrofotometria, através do equipamento Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, EUA), sendo posteriormente enviado para a genotipagem.

Foram encaminhadas para a genotipagem 318 amostras das fêmeas com suas respectivas leitegadas, sendo 278 amostras provenientes de IA heterospérmica e 40 amostras provenientes de IA homospérmica, utilizadas como contraprova para a confirmação dos procedimentos de IA.

As amostras de cada indivíduo foram colocadas em placas de 96 poços, sendo utilizados 96 SNP por poço, para identificação da paternidade (GABRIEL et al., 2009). Foi utilizado o painel SeekSire<sup>®</sup> para a espécie suína (Gene Seek Neogen Corporation, EUA). Posteriormente, as amostras foram genotipadas na plataforma Sequenom<sup>®</sup> MassArray<sup>®</sup>iPlex<sup>®</sup> (SEQUENON, 2012), seguindo o protocolo do fabricante.

Ao final da genotipagem, foi realizada a conferência do número de alelos compartilhados por estado (IBS), para cada loci, entre cada par de pretense pai (A,B,C ou D) e pretense filho, e a mãe. Os loci foram classificados como: IBS0, com nenhum alelo compartilhado; IBS1, com um alelo compartilhado; ou IBS2, = dois alelos compartilhados. Posteriormente, foi realizada a contagem do número de loci em cada classe. Como IBS0 indica inconsistência mendeliana, ou seja, com base na genotipagem, o pretense pai não pode ter contribuído com um alelo para o pretense filho, este foi adotado para a exclusão de paternidade. Para avaliação dos resultados foi utilizada uma abordagem descritiva: IBS0 (< ou = 3), indicando que não foi possível excluir o candidato da paternidade, permitindo que até três inconsistências mendelianas ocorressem sem exclusão da paternidade; IBS0 (> 3), com mais de três inconsistências mendelianas, o candidato é excluído da paternidade;

O software PLINK (Purcell et al., 2007) foi utilizado para a contagem de loci IBS0, IBS1 e IBS2, e scripts customizados em BASH e R para a exclusão (IBS0 >3) ou não exclusão do pai (IBS0 <=3). Em caso de inconclusividade (dois pretensos pais com IBS0 <= 3 ou todos pretensos pais com IBS0 > 3), as amostras foram consideradas para diagnóstico de problemas e re-genotipadas. Da mesma forma, amostras com reduzidos *call rates* (< 75%) ou IBS0 > 3 entre mãe-filho também foram estudadas caso a caso.

### **3.3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

As TP e o TN foram comparados entre as IA homospérmicas e heterospérmicas e entre os 10 grupos no estudo de Sávio (2012).

Inicialmente, foram geradas estatísticas descritivas. O número total de leitões nascidos e identificados após a genotipagem foi classificado entre os machos doadores de sêmen e entre os *pools*.

Considerando os leitões genotipados, a contribuição percentual de cada macho para a paternidade de cada leitegada também foi comparada, também considerando três categorias de TN: até 10 leitões; 11 a 13 leitões; e mais de 13 leitões. Como a distribuição desta variável não apresentava normalidade de acordo com o teste de Shapiro-Wilk ( $P < 0,05$ ), esta foi comparada através da análise de variância de *Kruskall Wallis* para dados não paramétricos. A média de leitões gerados na IA heterospérmica foi comparada entre os diferentes machos através de análise de variância. Todas as análises estatísticas foram conduzidas com o *software* Statistix® 9.0.

### 3.4 RESULTADOS

A genotipagem foi realizada para 4.019 leitões: 3.558 provenientes de IA heterospérmica, e 461 provenientes de IA homospérmica. Do total de 96 SNPs componentes do painel comercial SeekSire® (Tabela 1), apenas 68 SNPs foram utilizados efetivamente para a identificação da paternidade. Não foi possível identificar a paternidade em 207 amostras heteropérmicas (5,8% do total das amostras de IA heterospérmica). A maioria destas amostras era de esfregaço de tecidos colhidos dos leitões mumificados (aproximadamente 70%).

Um total de 511 fêmeas foram inseminadas das quais 204 receberam DI homospérmicas (39,9%) e 307 receberam DI Heterospérmicas (60,1%). A TP não diferiu ( $P > 0,05$ ) para as fêmeas que receberam IA Homospérmica (90,5%) ou heterospérmica (89,9%) (SÁVIO, 2012).

Considerando o TN por leitegada gerado através de IA homospérmica (Figura 1), o macho D apresentou a maior produção no entanto não diferindo dos demais machos A, B e C. Porém, ao considerar a IA heterospérmica, cinco *pools* estavam ranqueados na posição superior, com médias semelhantes à do macho D ( $P > 0,05$ ), enquanto que o *pool* AC estava ranqueado na posição inferior, com média de 11,5 nascidos totais ( $P > 0,05$ ).

A análise da contribuição individual de cada reprodutor para a paternidade em cada *pool* (Tabela 2) destacou o macho D como sendo o reprodutor com maior contribuição percentual de paternidade sobre todos os leitões nascidos. No *pool* CD,

de um total de 13,6 leitões nascidos, o macho D foi responsável pela paternidade de 8,7 leitões, enquanto que o macho C foi identificado como pai de 4,4 leitões. No *pool* BD, 8,5 leitões nascidos foram identificados como filhos do macho D e apenas 3,5 leitões foram filhos do macho B. A avaliação do reprodutor A, revelou no *pool* AB uma maior participação do macho A com um total de 7,9 nascidos contra 4,1 do macho B. Já no *pool* AC a participação de cada um dos reprodutores para o total de nascidos foi semelhante, ao redor de 5,5 nascidos totais para cada doador. Porém no *pool* AD de um total de 13,2 nascidos totais, o macho A foi identificado como pai de somente 4,5 leitões contra 7,7 identificados como filhos do macho D, demonstrando que o macho A reduziu sua participação para o TN quando seu sêmen foi misturado ao macho com melhor desempenho reprodutivo.

Considerando a contribuição média de cada indivíduo para a paternidade nas IA heterospérmicas (Tabela 3), nos três *pools* nos quais participou, o macho D foi o que apresentou a maior contribuição ( $P < 0,05$ ), o macho B apresentou a menor contribuição ( $P < 0,05$ ), enquanto que os machos A e C apresentaram contribuição intermediária, sem diferir entre si ( $P > 0,05$ ).

Nas três categorias de tamanho total das leitegadas (Tabela 4), o macho D contribuiu com pelo menos 60% da paternidade obtida por IA heterospérmica, independentemente do tamanho das leitegadas. Este percentual sempre foi superior ao observado para o macho B ( $P < 0,05$ ). Nas leitegadas com mais 13 leitões nascidos, a contribuição percentual do macho D foi superior à contribuição dos demais três machos ( $P < 0,05$ ).

A avaliação do percentual individual de paternidade incluindo as amostras inconclusivas (Tabela 5) demonstrou que o *pool* AC foi o único no qual a contribuição de cada um dos machos não diferiu ( $P > 0,05$ ). O macho D, em todos os *pools* em que estava incluído, apresentou contribuição superior a dos outros machos ( $P < 0,05$ ), com uma contribuição aproximada de 60% para a paternidade dos leitões. No *pool* AB, o macho A contribuiu com quase 60% da paternidade dos leitões nascidos, o que foi superior à contribuição do macho B ( $P < 0,05$ ). Porém, nos demais *pools*, a contribuição individual do macho A para a paternidade da leitegada, em comparação com a do outro macho incluído no pool, foi semelhante ( $P > 0,05$ ), no pool AC, ou inferior, no *pool* AD ( $P < 0,05$ ).

### 3.5 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo indicam que DI homospérmicas podem ser usadas para otimização do uso de reprodutores com elevado mérito genético e potencial fertilizante, sem prejuízo para o desempenho reprodutivo. Esta afirmação é corroborada a partir do desempenho do macho D, para o qual a média de TN por leitegada foi a mais elevada, quando o seu sêmen foi usado em DI homospérmicas, não diferindo da média observada para todos os *pools* nos quais este macho foi incluído. Ainda, a determinação genética da paternidade após IA heterospérmica, mostrou que a contribuição do macho D para a paternidade das leitegadas esteve em torno de 60%. Independentemente de diferenças significativas, ao se avaliar a contribuição do mesmo indivíduo em leitegadas com mais de 14 nascidos, este apresentou contribuição superior aos demais reprodutores.

Com IA homospérmica, houve regularidade de produção de leitões entre os machos: 592 para o macho A; 532 para o Macho B; 580 para o Macho C; e 583 para o Macho D (SÁVIO, 2012). Porém, a IA heterospérmica revelou grandes diferenças entre os indivíduos. O macho D gerou o maior número de leitões nascidos (1.120), o qual, se comparado com o macho B (591 leitões), apresentou uma diferença de 529 filhos a mais. Ou seja, o número de filhos do macho D gerados por IA heterospérmica é semelhante à soma do número de filhos do macho B gerados por IA homospérmica e heterospérmica. A comparação do número de filhos gerados pelo macho D e pelos demais reprodutores indicou uma diferença de 282 filhos a mais do que o macho A e 318 filhos a mais do que o macho C. Quando utilizado em IA homospérmica, o desempenho alcançado pelo macho D, com taxa de parição em torno de 90% e 13,0 TN por parto (SAVIO, 2012), está de acordo com as metas recomendadas para a indústria, (WILLEMBURG et al., 2012). Portanto, em heterospermia, o macho D aumentou ou manteve o mesmo desempenho, mas os demais machos apresentaram desempenho reduzido.

As taxas de parição não diferiram entre as IA homospérmica e heterospérmica (SAVIO, 2012), portanto o uso de DI heterospérmica não foi vantajoso, o que discorda dos dados de HAUGAN et al. (2005) que sugerem que a utilização de DI heterospérmicas podem aumentar o desempenho reprodutivo, através da maior competição entre os espermatozoides durante a fertilização.

Com o uso de IA homospérmica, machos subférteis seriam identificados mais facilmente e removidos do sistema de produção. Portanto, haveria um incremento no

mérito genético e no potencial fecundante dos reprodutores que permanecerem em atividade (FOXCROFT et al., 2008). Estas afirmações vão ao encontro com o preconizado por Dyck et al., (2012), que citam três fatores associados com a ineficiência da IA em suínos: a utilização de reprodutores subférteis ou com baixos índices reprodutivos, que diminuem a eficiência da produção de DI; a utilização de DI heterospérmicas provenientes de machos mal avaliados, que dificultam a avaliação entre o mérito genético individual e a paternidade da progênie produzida; e o elevado número de espermatozoides utilizados para produzir uma leitegada, exigindo da indústria um elevado número de reprodutores alojados para a produção de DI, reduzindo o mérito genético dos melhores reprodutores, especialmente quando comparados ao sistema de produção de bovinos corte ou leite, nos quais um reduzido número de touros superiores é usado para a produção de DI.

Portanto a identificação da fertilidade individual dos reprodutores pelo uso de IA homospérmica, possibilitaria reduzir o número de espermatozoides por DI, permitindo um uso mais eficiente do sêmen de machos comprovadamente superiores, podendo viabilizar a redução do número de espermatozoides por DI, o que contribuiria para otimizar a eficiência do sistema de produção (FOXCROFT et al., 2010b).

Na IA heterospérmica, houve uma redução no número de leitões gerados pelo *pool* AC (11,5 leitões), considerando que, individualmente, cada um dos reprodutores que compôs o *pool* produziu em média 12 leitões nascidos por parto na IA homospérmica (SAVIO, 2012). Estes dados vão ao encontro com os resultados de Foxcroft et al., (2010a) que relataram que o desempenho de dois machos usados em IA homospérmica foi reduzido quando os mesmo foram usados em IA heterospérmica, o que foi atribuído à interações entre o plasma seminal do sêmen destes indivíduos.

No *pool* AC a contribuição de cada macho para a paternidade dos leitões foi proporcional ao número de espermatozoides de cada reprodutor presente na DI, ou seja, 50%. Nos demais *pools*, sempre houve superioridade de um dos reprodutores sobre o outro. Para Dziuk (1996), estas diferenças observadas em cada *pool* são determinadas por condições inatas de cada um dos indivíduos, pois estes invariavelmente diferem em sua fertilidade, mesmo quando são proporcionadas oportunidades iguais a ambos. Tais diferenças somente seriam reduzidas mediante

ajustes na proporção de espermatozoides de um dos reprodutores durante a composição das DI heterospérmicas.

Durante a realização das genotipagens foi observado que, do total de 96 SNPs do painel SeekSire<sup>®</sup>, somente 68 foram efetivos para a determinação das paternidades. Destes, 20 foram identificados como discriminantes entre os grupos, podendo ser utilizados sem o genótipo da mãe. Os demais 48 SNPs serviram para a identificação da paternidade em conjunto com o genótipo da mãe. Foram excluídos 28 SNPs do painel de identificação, pois se encontravam fixados na população não sendo informativos para esse tipo de teste. A maior parte dos resultados de paternidade considerados inconclusivos nas IA heterospérmicas eram provenientes de amostras de tecido, as quais, na maior parte dos casos, foram colhidas de fetos mumificados. Portanto, os FTA Cards<sup>®</sup> não foram eficientes na armazenagem e extração do DNA através de esfregação de tecidos, o que discorda das especificações do fabricante, que indica o produto para armazenagem do DNA proveniente de tecidos, por vários anos (WHATMAN 2012b).

Neste experimento, foram utilizados quatro reprodutores, totalizando 10 tratamentos (4 homospérmicos e 6 heterospérmicos), com aproximadamente 50 fêmeas inseminadas por tratamento, totalizando 511 fêmeas. O delineamento do experimento previu que cada *pool* fosse composto por sêmen de dois reprodutores. A inclusão de somente mais dois reprodutores, ampliando para seis o número de machos a serem avaliados no presente estudo, exigiria um acréscimo de 550 fêmeas para sua execução. Em estudo avaliando a fertilidade de touros através de DI heterospérmicas compostas por sêmen de três reprodutores (FLINT et al., 2003) tiveram dificuldades na análise dos resultados gerados, concluindo que a utilização de sêmen de dois reprodutores por *pool* seria mais indicada do que o uso de *pools* com sêmen de mais de dois machos.

### **3.6 CONCLUSÃO**

Após a genotipagem dos leitões gerados por IA heterospérmica, foram identificadas grandes diferenças quanto à paternidade dos leitões, entre os quatro machos usados como doadores de sêmen, ainda que estes tenham apresentado desempenho semelhante com IA homospérmica. Um dos machos apresentou produção de leitões superior à dos demais, mas alguns indivíduos apresentaram desempenho reduzido com IA heterospérmica. Os marcadores SNP determinaram a paternidade de 95% dos leitões gerados por IA heterospérmica.

### 3.7 REFERÊNCIAS

ABCS. Manual brasileiro de boas práticas agropecuárias na produção de suínos. ABCS Associação brasileira de criadores de suínos ABCS/MAPA. Concórdia **Embrapa Suínos e Aves**, 2011, 140 p.

ABIPECS. Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína. **Relatórios anuais 2011/2012**. ABIPECS, 2012, 8 p.

BEARDEN, H.J.; FUQUAY, J.W. Semen collection. In: BEARDEN, H.J.; FUQUAY, J.W. **Applied Animal Reproduction**. 4<sup>th</sup> Ed. New Jersey: Prentice Hall. p. 147-157, 1997.

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

CBRA: COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. Belo Horizonte: **CBRA**, 49 p., 1998.

DIAL, G.D.; MARSH, W.E.; POLSON, D.D.; VAILLANCOURT, J.P. Reproductive failure: differential diagnosis. In: LEMAN, A.D.; STRAW, B.E.; MENGELING, W.L. *et al.* Ed. **Diseases of swine**. 7<sup>th</sup> Ed., Iowa State University Press, Ames, IA. p. 88-137. 1992.

DYCK, M.K.; FOXCROFT, G.R.; NOVAK, S. et al. Biological markers of boar fertility. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, p. 55–58, 2011.

DYCK, M.; FOXCROFT, G.; PATTERSON, J.; WILLEMBURG, K. Maximizing the impact of high value and high fertility boars. In: 12<sup>th</sup> Annual London Swine Conference, **Proceedings**. London, UK, 2012

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.

FLINT, A. F.; CHAPMAN, P. L.; SEIDEL JR, G. E. Fertility assessment through heterospermic insemination of flow-sorted sperm in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 81, p.1814-1822, 2003.

FOXCROFT, G.R.; DYCK, M.K.; RUIZ-SANCHEZ, A. et al. Identifying useable semen. **Theriogenology**, v. 70, p. 1324–1336, 2008.

FOXCROFT, G.R.; PATTERSON, J.; CAMERON, A.; DYCK, M.K. Application of advanced AI technologies to improve the competitiveness of the pork industry. In: 21<sup>st</sup> International Pig Veterinary Society Congress, **Proceedings**. Vancouver, Canada 2010a.

FOXCROFT, G.R.; PATTERSON, J.; DYCK, M.K. Improving production efficiency in a competitive industry. In: Manitoba Swine Seminar. **Proceedings**, Winnipeg, Canada, p 81-98, 2010b.

GABRIEL, S.; ZIAUGRA, L.; TABBAA, D. SNP genotyping using the SequenomMassARRAYiPLEX platform. **Current Protocols in Human Genetics**, Supplement. 60 p. 2.12.1-2.12.18, 2009.

GOFFAUX, F.; CHINA, B.; DAMS, L. et al. Development of a genetic traceability test in pig based on single nucleotide polymorphism detection. **Forensic Science International**, v. 151, p. 239–247, 2005.

HAUGAN, T.; REKSEN, O.; GRÖHN, Y.T.; GAUSTAD, A.H.; HOFMO, P.O. A retrospective study on effects of storage time of liquid boar semen on reproductive performance in Norwegian swine. **Theriogenology** 64 (2005) 891–901.

HARLIZIUS, B.; LOPES, M.S.; DUIJVESTIJN, N. et al. A single nucleotide polymorphism set for paternal identification to reduce the costs of trait recording in commercial pig breeding. **Journal of Animal Science**, v. 89, p .1661-1668, 2011.

HILL, W.G.; SALISBURY, B.A.; WEBB, A.J. Parentage identification using single nucleotide polymorphism genotypes: application. **Journal of Animal Science**, v. 86, p .2508-2517, 2008.

KERSTENS, H.D.; KOLLERS, S.; KOMMADATH, A. et al. Mining for single nucleotide polymorphisms in pig genome sequence data. **BMC Genomics**, v.10 p 1-9, 2009,

MAES, D.; LÓPEZ, R. A.; RIJSSELAERE, T. et al. Artificial insemination in pigs. In: **Artificial insemination in farm animals**. Edited by Milad Manafi. Croatia InTech Open v. 1 p. 79–94, 2011.

MARTINEZ, E.A.; VAZQUEZ, J.M.; ROCA, J. et al. An update on reproductive technologies with potential short-term application in pig production. **Reproduction Domestic Animals**, v. 40, p. 300–309, 2005.

MATSUMOTO, T.; OKUMURA, N.; UENISHI, H. et al. Population structure of pigs determined by single nucleotide polymorphisms observed in assembled expressed sequence tags. **Animal Science Journal**, v. 83, p. 14–22., 2012.

NEGRINI, R.; NICOLOSO, L.; CREPALDI, P. et al. Assessing SNP markers for assigning individuals to cattle populations. **International Society for Animal Genetics Animal Genetics**, v. 40, p. 18–26, 2008.

NOVAK, S.; O'DONOGHUE, R.; LEBOWA, G. et al. Fertility markers in boar semen. **Advances in Pork Production**, v.19 Abstract 28, 2008.

PURCELL, S.; NEALE, B.; TODD-BROWN, K. et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. **The American Journal of Human Genetics**, v. 81,p. 559 - 575 2007.

RAMOS, A.M.; MEGENS, H.J.; CROOIJMANS, R.P.M. A ;et al. Identification of high utility SNPs for population assignment and traceability purposes in the pig using high-throughput sequencing. **Animal Genetics**, p 1 – 8 2011.

ROCA, J.; PARRILLA, I.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. et al. Approaches towards efficient use of boar semen in the pig industry. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46 (Suppl. 2), p. 79–83, 2011.

ROHRER, G. A.; FREKING, B. A.; NONNEMAN, D. Single nucleotide polymorphisms for pig identification and parentage exclusion. **Animal Genetics**, v. 38, p. 253–258, 2007.

SÁVIO, Daniel Borges. **Desempenho reprodutivo com inseminação artificial em suínos com doses homospérmicas e heterospérmicas**. 2011. 42 p. Dissertação(Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. Universidade Federal de Pelotas.

SPÖTTER, A.; HAMANN, H.; MÜLLER, S.; DISTL, O. Effect of polymorphisms in four candidate genes for fertility on litter size in a german pig line. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, p. 579–584, 2010.

STAHLBERG, R; HARLIZIUS, B.; WEITZE, K.F.; WABERSKI, D. Identification of embryo paternity using polymorphic DNA markers to assess fertilizing capacity of spermatozoa after heterospermic insemination in boars. **Theriogenology**. v. 53, p. 1365 - 1373, 2000.

SEQUENON database 2012. Disponível em: <http://www.sequenom.com/sites/genetic-analysis/applications/snp-genotyping>.

TURBA M.E.; FANTINATI P.; BERNARDINI C. et al. Relationships between innovative and traditional parameters to investigate semen quality in pigs. **Animal Reproduction Science**. v. 99, p. 72-81, 2007.

STATISTIX®. Statistix® 9 analytical software. Tallahassee, FL, USA. 2008.

VIGNAL, A.; MILAN, D.; SANCRISTOBAL, M.; EGGEN, A. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. **Genet. Sel. Evol.** v. 34, p. 275-305, 2002.

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

WHATMAN a database 2012. Disponível em:

<http://www.whatman.com/FTANucleicAcidCollectionStorageandPurification.asp>

WHATMAN b database 2012. Disponível em: <http://www.whatman.com/FTANucleicAcidCollectionStorageandPurification.aspx#SupportDocumentation>

WILLEMBURG, K.; DICK, M.; FOXCROFT, G.; PATTERSON, J. Tools techniques and strategies to improve reproductive performance and genetic progress. In: 12<sup>th</sup> Annual London Swine Conference, **Proceedings**. London 2012.

### 3.8 ANEXOS

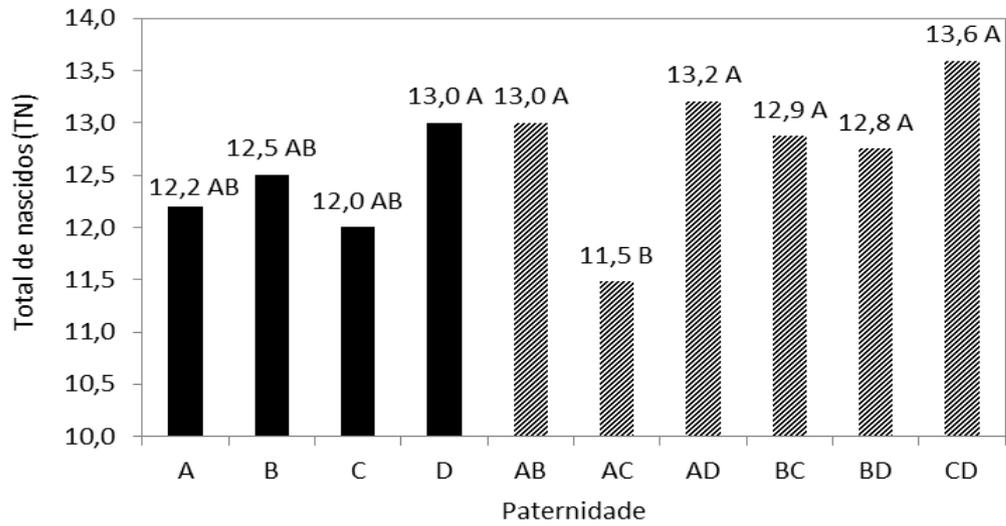


Figura 1: Total de nascidos por leitegada com IA homospérmica (machos A, B, C e D) ou heterospérmica (pools AB, AC, AD, BC, BD e CD). (Sávio, 2012)

<sup>A,B</sup>Exponentes distintos indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ )

Tabela 1: Painel de marcadores SNP para paternidade em suínos SeekSire®

Marcador	Descrição	Marcador	Descrição	Marcador	Descrição	Marcador	Descrição
MARC0002500	①	MARC0034983	③	MARC0057599	③	MARC0085717	②
MARC0012087	②	MARC0035863	②	MARC0058294	③	MARC0085722	②
MARC0013873	①	MARC0035886	②	MARC0058847	②	MARC0088091	①
MARC0014344	④	MARC0036375	③	MARC0059303	②	MARC0089437	②
MARC0015385	①	MARC0036708	②	MARC0060657	①	MARC0089489	①
MARC0020951	①	MARC0036725	①	MARC0060820	②	MARC0089921	①
MARC0021307	②	MARC0037294	③	MARC0060957	②	MARC0089972	①
MARC0022388	①	MARC0037295	③	MARC0062781	③	MARC0091567	④
MARC0025520	①	MARC0040061	②	MARC0063986	④	MARC0092163	①
MARC0026394	③	MARC0041890	②	MARC0064308	③	MARC0092210	②
MARC0026950	②	MARC0043859	①	MARC0064312	②	MARC0092955	①
MARC0028430	③	MARC0044793	②	MARC0066508	③	MARC0093055	①
MARC0028812	②	MARC0045269	②	MARC0067107	②	MARC0094480	②
MARC0029459	③	MARC0047165	②	MARC0070868	②	MARC0094560	②
MARC0029665	③	MARC0048682	②	MARC0070952	③	MARC0096049	③
MARC0029888	①	MARC0048886	②	MARC0071223	③	MARC0102724	②
MARC0030180	②	MARC0049963	②	MARC0071898	③	MARC0102878	①
MARC0030522	②	MARC0050287	②	MARC0074362	②	MARC0104045	①
MARC0030589	②	MARC0050788	③	MARC0074610	①	MARC0111751	②
MARC0030899	②	MARC0052461	③	MARC0075511	②	MARC0112888	②
MARC0031510	③	MARC0052559	②	MARC0075587	②	MARC0112924	③
MARC0031610	②	MARC0052855	③	MARC0076403	③	MARC0113081	②
MARC0032048	②	MARC0053715	②	MARC0077362	②	MARC0114647	②
MARC0032253	②	MARC0055700	③	MARC0083543	②	MARC0115474	③

① SNPs discriminantes entre grupos podem ser usados sozinhos ② SNPs homocigotos e heterocigotos que podem ser utilizados com o genótipo da mãe ③ SNPs fixados em homocigose ④ SNPs fixados em heterocigose.

Tabela 2: Número total de leitões nascidos por dose inseminante (*pool*) e por macho após inseminação artificial heterospérmica

<i>Pool</i>	Paternidade	Total de leitões	Total de leitões nascidos/macho	
			Média*	(%)
AB	A	356	7,9	60,8
	B	183	4,1	31,3
	Inconclusiva	46	1,0	7,9
Total		585	13,0	
AC	A	277	5,6	49,2
	C	258	5,3	45,8
	Inconclusiva	28	0,6	5,0
Total		563	11,5	
AD	A	205	4,5	33,8
	D	355	7,7	58,5
	Inconclusiva	47	1,0	7,7
Total		607	13,2	
BC	B	252	5,1	40,0
	C	350	7,1	55,5
	Inconclusiva	29	0,6	4,5
Total		631	12,9	
BD	B	156	3,5	27,2
	D	384	8,5	66,9
	Inconclusiva	34	0,8	5,8
Total		574	12,8	
CD	C	194	4,4	32,4
	D	381	8,7	63,8
	Inconclusiva	23	0,5	3,8
Total		598	13,6	

\*Adaptados de SÁVIO (2012)

Tabela 3: Número total de leitões gerados com inseminação artificial (IA) com doses homospérmicas e heterospérmicas por macho

Machos	Número de leitões gerados				
	IA homospérmica*	IA heterospérmica			Total geral
		Leitegadas	Média	Total	
A	592	133	$6,3 \pm 0,3^B$	838	1.430
B	532	128	$4,6 \pm 0,3^C$	591	1.123
C	580	140	$5,7 \pm 0,3^B$	802	1.382
D	583	135	$8,3 \pm 0,3^A$	1.120	1.703
Inconclusivas		118		207	207
Total	2.287			3.558	5.845

\*Adaptado de SÁVIO (2012).

Tabela 4: Percentual de paternidade por macho em leitegadas com diferente número total de leitões nascidos após inseminação artificial com doses heterospermicas.

Paternidade	Total de leitões nascidos/leitegada		
	< 11	11-13	14 +
A	45,4 ± 5,0 <sup>AB</sup>	49,3 ± 3,8 <sup>AB</sup>	46,5 ± 3,4 <sup>B</sup>
B	33,7 ± 4,4 <sup>B</sup>	31,8 ± 2,6 <sup>C</sup>	34,1 ± 2,8 <sup>C</sup>
C	48,2 ± 4,4 <sup>AB</sup>	45,5 ± 3,3 <sup>B</sup>	41,8 ± 2,8 <sup>BC</sup>
D	61,5 ± 4,7 <sup>A</sup>	61,2 ± 3,1 <sup>A</sup>	64,8 ± 2,6 <sup>A</sup>
Inconclusiva	23,5 ± 5,1	13,4 ± 1,5	12,1 ± 0,8

A, B, C Letras diferentes na coluna diferem por pelo menos P < 0,05

Tabela 5: Percentual de paternidade por dose inseminante após inseminação artificial com doses heterospérmicas.

Paternidade	Dose inseminante					
	AB	AC	AD	BC	BD	CD
A	59,8 ± 3,3 <sup>A</sup>	48,9 ± 3,6 <sup>A</sup>	33,2 ± 3,9 <sup>B</sup>			
B	32,6 ± 3,6 <sup>B</sup>			39,5 ± 3,0 <sup>B</sup>	24,5 ± 2,5 <sup>B</sup>	
C		45,8 ± 3,4 <sup>A</sup>		55,3 ± 3,1 <sup>A</sup>		31,0 ± 2,5 <sup>B</sup>
D			59,0 ± 3,8 <sup>A</sup>		64,6 ± 2,8 <sup>A</sup>	65,1 ± 2,8 <sup>A</sup>
Inconclusiva	14,2 ± 1,7	17,2 ± 2,8	14,3 ± 1,6	9,4 ± 0,7	18,6 ± 5,3	13,0 ± 2,1

<sup>A,B</sup> Letras diferentes na coluna diferem por pelo menos  $P < 0,05$ . Calculado sobre o total de nascidos de cada leitegada, independente do tamanho da leitegada.