

Desempenho reprodutivo de fêmeas suínas inseminadas pela técnica intra-uterina ou tradicional

Djane Dallanora⁽¹⁾, Alisson Mezalira⁽¹⁾, Lia Helena Katzer⁽²⁾, Mari Lourdes Bernardi⁽³⁾,
Fernando Pandolfo Bortolozzo⁽¹⁾ e Ivo Wentz⁽¹⁾

⁽¹⁾Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Faculdade de Veterinária, Setor de Suínos, Av. Bento Gonçalves, 9090, CEP 91540-000 Porto Alegre, RS. E-mail: ddallanora@yahoo.com.br, amezalira@yahoo.com.br, fpbortol@ufrgs.br, ivowentz@ufrgs.br ⁽²⁾Perdigão Agroindustrial S/A, Rodovia BR 060, Km 394, Caixa Postal 351, CEP 75901-970 Rio Verde, GO. E-mail: lkatz@uol.com.br ⁽³⁾UFRGS, Faculdade de Agronomia, Dep. de Zootecnia, Av. Bento Gonçalves, 7712, CEP 91540-000 Porto Alegre, RS. E-mail: bernardi@orion.ufrgs.br

Resumo – O desempenho reprodutivo de fêmeas suínas foi avaliado com o objetivo de comparar duas técnicas de inseminação. Foram inseminadas, em delineamento inteiramente casualizado, 608 fêmeas com ordem de parto de dois a quatro, em dois tratamentos: inseminação intra-uterina com 1,5 bilhão de espermatozoides em 60 mL e inseminação tradicional, com 3 bilhões em 90 mL. Foi possível introduzir o cateter intra-uterino em 97,4% das fêmeas e houve sangramento em 9,5%, as quais apresentaram retorno ao estro superior ($p < 0,05$). O percentual de volume refluído até duas horas após a inseminação foi maior ($p < 0,05$) na inseminação intra-uterina do que na tradicional, enquanto o percentual de espermatozoides refluídos foi semelhante. Não houve influência do percentual de espermatozoides refluídos sobre a taxa de parto e tamanho da leitegada. Não houve diferença nas taxas de retorno ao estro (3,6% e 4,3%), de prenhez aos 21 dias (99,5% e 97,2%), de parto ajustada (94,9% e 94,3%) e tamanho da leitegada (11,6 e 11,8 leitões) entre os dois tratamentos, respectivamente. A inseminação intra-uterina permite a obtenção de desempenho reprodutivo semelhante ao observado na tradicional, porém com uso de menor número de espermatozoides.

Termos para indexação: número de espermatozoides, parto, refluxo de sêmen, reprodução, tamanho da leitegada, taxa de prenhez.

Reproductive performance of swine females inseminated by intrauterine or traditional technique

Abstract – The reproductive performance of sows was evaluated aiming at the comparison of two insemination techniques. In a completely randomized design, 608 females of 2–4 parities were inseminated in two treatments: intrauterine with 1.5×10^9 spermatozoa/60 mL or traditional insemination with 3×10^9 spermatozoa/90 mL. It was possible to insert the intrauterine catheter in 97.4% of females and bleeding was observed in 9.5%, which had a higher probability to repeat estrus ($p < 0.05$). The percentage of semen backflow volume, during two hours after insemination, was significantly higher ($p < 0.05$) in intrauterine insemination than traditional, whereas sperm backflow percentage was similar. The sperm backflow percentage did not influence the farrowing rate and the litter size. There was no difference in the return to estrus rate (3.6%; 4.3%), pregnancy rate at 21 days post-insemination (99.5%; 97.2%), adjusted farrowing rate (94.9%; 94.3%) and average litter size (11.6; 11.8 piglets) between treatments, respectively. The intrauterine insemination ensures a reproductive performance similar to traditional, but with a lower sperm number.

Index terms: sperm number, farrowing, semen backflow, reproduction, litter size, pregnancy rate.

Introdução

Na inseminação com deposição cervical na espécie suína, tradicionalmente, a dose inseminante contém de 2 a 4 bilhões de espermatozoides, em volume de 80 a 100 mL, que podem ser armazenados por até três dias à temperatura de 15°C a 18°C (Martinez et al., 2001; Bortolozzo et al., 2003). A inseminação pode ser repetida duas a três vezes durante o estro, podendo totalizar 12 bilhões de espermatozoides (Rath et al., 2000).

A necessidade de grande volume e número de espermatozoides na dose inseminante deve-se, provavelmente, às características anatômicas da cerviz e dos cornos uterinos da fêmea suína. Os cornos uterinos, com comprimento de 50 cm ou mais (Watson & Behan, 2002), e a cerviz representam grandes barreiras fisiológicas para a chegada das células espermáticas ao reservatório na junção útero-tubárica. Nesse percurso, os espermatozoides estão sujeitos à ação fagocitária dos polimorfonucleares (Rozeboom et al., 1998) que, aliada

ao refluxo (Steerink et al., 1998), pode ser a principal forma de eliminação espermática do trato genital feminino.

Há mais de 40 anos, estudos já haviam sido efetuados a fim de determinar o número de espermatozoides e o volume da dose inseminante necessários ao bom desempenho reprodutivo com a deposição intra-uterina de sêmen (Hancock, 1959; Hancock & Hovell, 1961). No entanto, a utilização da inseminação artificial em suínos, em grande escala, foi alcançada com a técnica de deposição do sêmen na cerviz. Nos últimos cinco anos, os estudos com inseminação artificial cirúrgica confirmaram a possibilidade de reduzir o número de espermatozoides com a deposição da dose inseminante próximo à junção útero-tubárica (Krueger et al., 1999; Krueger & Rath, 2000). Já que a técnica cirúrgica não pode ser realizada de forma rotineira nas granjas suinícolas, instrumentos que viabilizam a deposição do sêmen o mais próximo possível do local da fecundação, de forma não-cirúrgica, foram desenvolvidos (Vazquez et al., 2000; Martinez et al., 2001; Watson & Behan, 2002), de modo a possibilitar o uso de menor número de espermatozoides. Porém, existem poucos estudos comparativos entre as duas técnicas, em condições de campo, em granjas comerciais.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho reprodutivo de fêmeas suínas submetidas à inseminação artificial intra-uterina e tradicional.

Material e Métodos

O trabalho foi realizado numa granja comercial, com produção de suínos em ciclo completo, na região do Centro-Oeste brasileiro, no período de janeiro a julho de 2002. Em delineamento inteiramente casualizado, foram utilizadas 608 fêmeas pluríparas da linhagem Camborough 22 (Agrocercos-PIC), com ordem de parto de dois a quatro, intervalo desmame-estro entre dois e seis dias, duração da lactação entre 15 e 19 dias e tamanho médio de leitegada nos partos anteriores superior a nove leitões. Após o início do estro, as fêmeas foram distribuídas uniformemente, considerando as características citadas anteriormente, em dois tratamentos. No tratamento inseminação intra-uterina (IAU), as fêmeas (n = 304) foram inseminadas com pipeta de inseminação artificial (IA) descartável e um cateter de polipropileno, de 4 mm de diâmetro externo, que deslizava internamente à pipeta, estendendo-se 20 cm além da cerviz, alcançando o corpo do útero ou um dos cor-

nos uterinos e permitindo a deposição intra-uterina da dose inseminante. No tratamento inseminação tradicional (IAT), as fêmeas (n = 304) receberam inseminação cervical, com pipeta de borracha do tipo Melrose.

A coleta do sêmen dos seis machos doadores foi realizada pelo método da mão enluvada, duas vezes por semana. A concentração foi aferida por contagem direta de espermatozoides em câmara hemocitométrica. Os ejaculados foram diluídos em Beltsville Thawing Solution (BTS), em doses de 1,5 bilhão de espermatozoides em 60 mL ou de 3 bilhões em 90 mL, na IAU e IAT, respectivamente. Todas as doses foram produzidas em “split sample”, ou seja, as doses utilizadas em ambos os tratamentos foram produzidas a partir dos mesmos ejaculados. Foi realizada uma contagem de contraprova para aferir a concentração de cada dose produzida.

Após o desmame, foi realizada a detecção do estro, duas vezes ao dia, pelo reflexo de tolerância ao homem na presença do macho. A primeira inseminação foi realizada no turno subsequente ao início do estro, repetindo-se em intervalos de oito a 16 horas, podendo ser realizada uma quarta inseminação, 24 horas após a terceira. Casos de presença de sangue na pipeta ou no refluxo, após a IA, foram registrados.

Foi coletado o refluxo de sêmen em 32 fêmeas de cada tratamento, no momento da IA e até duas horas após, utilizando bolsas de colostomia descartáveis, aderidas à região perivulvar. O volume total de refluxo foi pesado e o número total de espermatozoides foi contado em câmara hemocitométrica. Foi efetuado o diagnóstico de retorno ao estro a partir dos 18 e até 23 dias após a IA, pelo teste de reflexo de tolerância ao homem na presença do macho. O diagnóstico de gestação, utilizado para o cálculo da taxa de prenhez, foi realizado aos 20–22 dias após a IA, por ultra-sonografia transcutânea em tempo real, com transdutor linear convexo de 5 MHz, em 210 e 211 fêmeas submetidas à inseminação intra-uterina e tradicional, respectivamente. No parto, foram coletados dados referentes ao número de leitões nascidos.

As taxas de retorno ao estro, de prenhez e de parto ajustada – calculada excluindo-se todos os animais que não pariram por causas não reprodutivas – e a presença de sangue após a realização da IA foram analisadas pelo teste do qui-quadrado. Os dados de tamanho de leitegada de todas as fêmeas que pariram foram submetidos à análise de variância pelo procedimento GLM (SAS Institute, 1999), sendo as médias comparadas pelo

teste t. Foram calculados os percentuais de volume e de espermatozoides refluídos nas 64 fêmeas submetidas à coleta de refluxo de sêmen após a IA (32 de cada tratamento), considerando o total de inseminações recebidas por fêmea. Esses percentuais foram submetidos à análise não-paramétrica pelo procedimento NPAR1WAY (SAS Institute, 1999), e a comparação entre os tratamentos foi efetuada pelo método de Mann-Whitney. Foi analisada a correlação do percentual de volume e de espermatozoides no refluxo com o número de leitões nascidos. Além disso, as fêmeas foram separadas em duas categorias, de acordo com o percentual de perda de espermatozoides no refluxo: abaixo de 20%, baixo, e acima de 20%, alto. As taxas de parto e o número de leitões nascidos foram comparados entre os grupos de fêmeas de acordo com esses percentuais de perda. Em todas as análises, o nível de significância foi 5%.

Resultados e Discussão

Foi possível a introdução do cateter no lúmen uterino em 97,4% das fêmeas submetidas à inseminação intra-uterina (304/312). Desde o início das pesquisas com a deposição intra-uterina de sêmen suíno, independentemente do tipo de equipamento utilizado, como endoscópios (Vazquez et al., 2000), cateteres flexíveis (Martinez et al., 2001, 2002; Vazquez et al., 2003) e pipetas específicas para IAU (Wolken, 2001; Watson & Behan, 2002; Mezalira et al., 2003), o sucesso da passagem da pipeta e do cateter no trato genital das fêmeas sempre foi superior a 90%, inclusive no trabalho em que as inseminações foram conduzidas pelos funcionários das granjas (Watson & Behan, 2002). Provavelmente, características individuais das fêmeas sejam responsáveis pela dificuldade ou facilidade de passagem do cateter, já que, em pesquisa anterior, nem a ordem de parto, com amplitude de dois a seis, nem a duração da lactação, de 16 a 27 dias, tiveram influência sobre este aspecto (Martinez et al., 2002).

Foi observada a presença de sangue no cateter ou no sêmen refluído, pelo menos em uma das IAU, em 9,5% das fêmeas (29/304). A taxa de retorno ao estro foi superior ($p < 0,01$) nas fêmeas com sangramento (4/29; 13,8%) em comparação à observada nas fêmeas sem sangramento (7/275; 2,6%). Watson & Behan (2002) utilizaram o mesmo tipo de pipeta empregada neste trabalho e observaram presença de sangue em 1,8% das fêmeas, mas não avaliaram o efeito deste evento sobre a taxa de retorno ao estro. A passagem do cateter de

IAU utilizado não é possível em fêmeas nulíparas ou primíparas. A maior ocorrência de sangramento, neste trabalho, talvez possa ser explicada pela inseminação de fêmeas de ordem de parto dois a quatro, inferior às utilizadas (2 a 11) por Watson & Behan (2002). Além disso, esses autores somente registraram a presença de sangue por ocasião da remoção do cateter de inseminação enquanto, neste estudo, foi considerada também a presença de sangue no refluxo pós-inseminação.

O percentual de volume refluído até duas horas após a IA foi maior nas fêmeas IAU ($p < 0,01$) quando comparadas às fêmeas IAT, não existindo diferenças ($p > 0,05$) no percentual de células espermáticas presentes no refluxo (Tabela 1). É possível que a deposição dos espermatozoides no terço inicial/médio do útero facilite a progressão rápida em direção ao reservatório espermático, permitindo maior retenção de células no trato genital, mesmo com grande volume de refluxo. Outra hipótese é que a presença do cateter no corpo ou corno uterino pode induzir a uma maior liberação de hormônios que estimulam a contratilidade uterina, permitindo um transporte espermático mais eficiente (Martinez et al., 2002). Além disso, a IAU possibilita uma diminuição da perda das células que ficariam depositadas nos anéis cervicais, já que o sêmen é depositado diretamente dentro do útero.

O refluxo vulvar de sêmen após a inseminação parece ser freqüente em suínos. Os percentuais de volume e de espermatozoides no refluxo observados com a IAT, foram semelhantes aos verificados em trabalhos anteriores (Steverink et al., 1998; Flores, 2001). Com a IAU, contrariando o esperado, grande percentual de volume refluído foi observado. A amplitude do percentual de volume de refluxo variou de zero a valores superiores a 100% em ambos os tratamentos, sendo que uma fêmea IAU e cinco IAT apresentaram refluxo igual a zero e 14 fêmeas IAU e uma IAT apresentaram refluxo superior a 100%. A grande amplitude observada no percentual

Tabela 1. Percentual de volume e de espermatozoides refluídos até 120 minutos após a inseminação intra-uterina ou inseminação tradicional em fêmeas suínas.

Inseminação	Volume refluído (%) ⁽¹⁾			Espermatozoides refluídos (%) ⁽²⁾		
	Média	Mediana	Amplitude	Média	Mediana	Amplitude
Intra-uterina	75,4±24,9	81,7	0-121,7	22,7±14,2	21,2	0-85,7
Tradicional	62,7±24,7	66,7	0-111,1	23,0±14,2	20,0	0-62,7

⁽¹⁾Significativo, na coluna, a 5% de probabilidade pelo teste de Mann-Whitney. ⁽²⁾Não-significativo, na coluna, a 5% de probabilidade pelo teste de Mann-Whitney.

de volume refluído está de acordo com os dados de outros autores que, utilizando IAT, observaram volume de refluxo entre 20% e 120% (Steверink et al., 1998) ou entre zero e 118% (Flores, 2001), evidenciando a presença de secreção proveniente do trato genital feminino na constituição do volume total de refluxo. Conforme Steверink et al. (1998) e Flores (2001), os valores de refluxo são variáveis entre fêmeas e entre as inseminações de uma mesma fêmea. Ao considerar os dados das inseminações, em cada fêmea, foi confirmada essa variação, sendo possível apresentar alto volume de refluxo em uma das inseminações e baixo percentual na inseminação subsequente ou vice-versa.

Segundo Hancock (1959) e Levis et al. (2002), a IAU permite a diminuição da perda de células espermáticas por refluxo vulvar durante e após a realização da inseminação artificial. Steверink et al. (1998) observaram que perdas superiores a 5% do número de espermatozoides no momento da inseminação artificial afetaram negativamente a fecundação em fêmeas inseminadas com 1 bilhão de espermatozoides, mas não naquelas inseminadas com 3 e 6 bilhões, evidenciando a importância do refluxo em inseminações com baixo número de espermatozoides. Não foi registrado nenhum caso de refluxo no momento da IAU, confirmando que esta técnica permite reduzir as perdas no momento da inseminação. Por outro lado, as perdas de espermatozoides, até duas horas após a inseminação, não diferiram ($p>0,05$) entre IAU e IAT (Tabela 1). Essas perdas não influenciaram a taxa de parto e o número de leitões nascidos, em ambos os tratamentos ($p>0,05$), independentemente de serem inferiores ou superiores a 20% (Tabela 2). O fato de terem sido realizadas várias inseminações em cada fêmea pode ter contribuído para a não ocorrência de diferenças nas taxas de prenhez, bem como para a ausência de correlação entre o percentual de espermatozoides no refluxo ($p>0,05$) e o número de leitões nascidos.

Tabela 2. Taxa de parto e número de leitões nascidos em relação aos níveis baixo (inferior a 20%) ou alto (superior a 20%) do percentual de espermatozoides no refluxo da inseminação intra-uterina ou tradicional.

Inseminação	Taxa de parto ⁽¹⁾		Nascidos totais ⁽²⁾	
	Baixo	Alto	Baixo	Alto
Intra-uterina	15/15 (100)	15/16 (93,8)	11,5±2,0	11,9±3,8
Tradicional	8/9 (88,9)	21/21 (100)	11,2±1,7	11,5±3,5

⁽¹⁾Não-significativo, na linha, a 5% de probabilidade, pelo teste de qui-quadrado. ⁽²⁾Não-significativo, na linha, a 5% de probabilidade, pelo teste t.

Não houve diferença ($p>0,05$) nas taxas de retorno ao estro, de prenhez, de parto, de parto ajustada e no número de leitões nascidos (Tabela 3). Isto indica que a deposição intra-uterina de 1,5 bilhão de espermatozoides permitiu a formação eficiente do reservatório espermático na junção útero-tubárica e adequada fecundação. As taxas de prenhez e de parto de ambos os tratamentos foram superiores às observadas normalmente nas granjas. Provavelmente, o fato de não terem sido selecionadas fêmeas com intervalo desmame-estro prolongado, magras, com problemas de aparelho locomotor, com retorno ao estro ou com lactação prolongada, pode ter influenciado positivamente nos resultados de ambos os tratamentos.

A dose inseminante de 1,5 bilhão de espermatozoides parece não ser o limite máximo de redução permitido pela técnica de deposição intra-uterina do sêmen, embora, em condições comerciais, poucos trabalhos tenham sido realizados para confirmar o sucesso da aplicação desta técnica com número reduzido de espermatozoides. Watson & Behan (2002) inseminaram fêmeas na rotina normal de IA de diferentes granjas com a técnica intra-uterina, e obtiveram 86,9% de parto e 12,1 leitões nascidos com doses de um bilhão de espermatozoides. Embora Martinez et al. (2002) tenham alcançado taxas de parto de 76,2% e 82,9%, utilizando 50 e 150 milhões de espermatozoides em 5 mL de diluente, em inseminação única, as taxas de prenhez observadas por Wolken (2001) foram inferiores, com doses de 500 e 100 milhões de espermatozoides em 20 mL (77,3 e 65,2%, respectivamente). Bennemann et al. (2003) constataram que as taxas de prenhez e o número de embriões de 57 fêmeas submetidas a uma única IAU, em intervalos IAU-ovulação de 0 a 24 horas ou 25 a 36 horas, foram semelhantes para doses de 1 e 2 bilhões de espermatozoides em 60 mL de diluente. Mezalira et al. (2003) trabalharam com IAU direcionada para um in-

Tabela 3. Desempenho reprodutivo de fêmeas suínas após inseminação intra-uterina ou tradicional.

Parâmetros	Intra-uterina	Tradicional
Inseminações por fêmea (n ^o) ⁽¹⁾	3,3±0,48	3,3±0,48
Taxa de retornos ao estro (%) ⁽²⁾	3,6 (11/304)	4,3 (13/304)
Taxa de prenhez (%) ⁽²⁾	99,5 (209/210)	97,2 (205/211)
Taxa de parto (%) ⁽²⁾	92,8 (282/304)	93,4 (283/303)
Taxa de parto ajustada (%) ⁽²⁾	94,9 (282/297)	94,3 (283/300)
Total de leitões nascidos (n ^o) ⁽¹⁾	11,6±2,6 (282)	11,8±2,8 (283)

⁽¹⁾Médias±desvio-padrão; não-significativo, na linha, a 5% de probabilidade, pelo teste t. ⁽²⁾Não-significativo, na linha, a 5% de probabilidade, pelo teste de qui-quadrado.

terval de 0–24 horas entre IAU-ovulação e obtiveram taxas de prenhez de 85,5% com 500 milhões de espermatozoides em 20 mL, com redução significativa para 77,1%, quando a dose continha 250 milhões de espermatozoides. Esses dados apontam para a possibilidade de investigar o uso comercial da IAU com doses inferiores a 1 bilhão de espermatozoides, além de avaliar estratégias de IA, associando o número mínimo de espermatozoides necessários e o intervalo ideal entre a deposição intra-uterina do sêmen e o momento da ovulação.

Conclusão

A inseminação intra-uterina de fêmeas suínas, de ordem de parto dois a quatro, com doses de 1,5 bilhão de espermatozoides, permite a obtenção de desempenho reprodutivo semelhante ao observado com a inseminação cervical tradicional, com doses de 3 bilhões de espermatozoides.

Referências

- BENNEMANN, P.E.; MILBRADT, E.; DIEHL, G.N.; VIDOR, R.; FRIES, H.C.C.; BERNARDI, M.; WENTZ, I.; BORTOLOZZO, F.P. Desempenho reprodutivo de fêmeas suínas submetidas à inseminação intra-uterina com 1 e 2 x 10⁹ espermatozoides em diferentes intervalos pré-ovulatórios. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 11., 2003, Goiânia. **Anais**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2003. p.211-212.
- BORTOLOZZO, F.P.; DALLANORA, D.; BERNARDI, M.L.; BENNEMANN, P.E.; WENTZ, I. Técnicas associadas à inseminação artificial no suíno que visam à redução do número de espermatozoides necessários por fêmea ao ano. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, p.133-139, 2003.
- FLORES, L.A.S. **Comparação entre os métodos “auto-IA”, intermediário e tradicional de inseminação artificial em suínos**. 2001. 61p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- HANCOCK, J.L. Pig insemination technique. **Veterinary Record**, v.71, p.523-527, 1959.
- HANCOCK, J.L.; HOVELL, J.R. The effect of semen volume and number of spermatozoa on the fertility of intra-uterine inseminations of pigs. **Animal Production**, v.3, p.153-160, 1961.
- KRUEGER, C.; RATH, D. Intrauterine insemination in sows with reduced sperm number. **Reproduction Fertility and Development**, v.12, p.113-117, 2000.
- KRUEGER, C.; RATH, D.; JOHNSON, L.A. Low dose insemination in synchronized gilts. **Theriogenology**, v.52, p.1363-1373, 1999.
- LEVIS, D.G.; BURROUGHS, S.; WILLIAMS, S. Use of intra-uterine insemination of pigs: pros, cons and economics. 2002. Disponível em: <<http://www.porkinfo.osu.edu>>. Acesso em: 01 nov. 2002.
- MARTINEZ, E.A.; VAZQUEZ, J.M.; ROCA, J.; LUCAS, X.; GIL, M.A.; PARRILLA, I.; VAZQUEZ, J.L.; DAY, N. Minimum number of spermatozoa required for normal fertility after deep intrauterine insemination in non-sedated sows. **Reproduction**, v.123, p.163-170, 2002.
- MARTINEZ, E.A.; VAZQUEZ, J.M.; ROCA, J.; LUCAS, X.; GIL, M.A.; PARRILLA, I.; VAZQUEZ, J.L.; DAY, N. Successful non-surgical deep intrauterine insemination with small numbers of spermatozoa in sows. **Reproduction**, v.122, p.289-296, 2001.
- MEZALIRA, A.; DALLANORA, D.; SCHMIDT, A.C.T.; ZILLI, R.; BERNARDI, M.L.; WENTZ, I.; BORTOLOZZO, F.P. Inseminação intra-uterina em fêmeas suínas com redução no volume e número de espermatozoides. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 11., 2003, Goiânia. **Anais**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2003. p.217-218.
- RATH, D.; KRUEGER, C.; JOHNSON, L.A. Low dose insemination technique in the pig. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BOAR SEMEN PRESERVATION, 4., 2000, Beltsville. **Proceedings**. Lawrence: Allen Press, 2000. p.115-118.
- ROZEBOOM, K.J.; TROEDSSON, M.H.T.; CRABO, B.G. Characterization of uterine leukocyte infiltration in gilts after artificial insemination. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.114, p.195-199, 1998.
- SAS INSTITUTE (Cary, Estados Unidos). **Sas user's guide: statistical analysis system**. Version 8, Cary, 1999. 1464p.
- STEVERINK, D.W.B.; SOEDE, N.M.; BOUWMAN, E.G.; KEMP, B. Semen backflow after insemination and its effect on fertilisation results in sows. **Animal Reproduction Science**, v.54, p.109-119, 1998.
- VAZQUEZ, J.L.; MARTINEZ, E.A.; VAZQUEZ, J.M.; LUCAS, X.; GIL, M.A.; PARRILLA, I.; ROCA, J. Development of a non-surgical deep intrauterine insemination technique. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BOAR SEMEN PRESERVATION, 4., 2000, Beltsville. **Proceedings**. Lawrence: Allen Press, 2000. p.262-263.
- VAZQUEZ, J.M.; MARTINEZ, E.A.; PARRILLA, I.; ROCA, J.; GIL, M.A.; VAZQUEZ, J.L. Birth of piglets after deep intrauterine insemination with flow cytometrically sorted boar spermatozoa. **Theriogenology**, v.59, p.1605-1614, 2003.
- 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.
- WOLKEN, A.W. **Untersuchungen zur unchirurgischen und chirurgischen distalen intrauterinen Besamung mit reduzierter Spermienzahl bei Jung- und Altsauen**. 2001. 135p. Doktorarbeit - Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover.