DILUIDORES E VOLUMES DE SÊMEN DESTINADOS À INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL INTRA-UTERINA EM SUÍNOS

ANA LUÍSA NEVES ALVARENGA

2008

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

ANA LUÍSA NEVES ALVARENGA

DILUIDORES E VOLUMES DE SÊMEN DESTINADOS À INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL INTRA-UTERINA EM SUÍNOS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração Fisiopatologia e Biotecnologia da Reprodução Animal, para obtenção do título de "Mestre".

Orientador
Prof. Dr. Luis David Solis Murgas

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da UFLA

Alvarenga, Ana Luísa Neves.
Diluidores e volumes de sêmen destinados à inseminação artificial intra-uterina em suínos / Ana Luísa Neves Alvarenga. -- Lavras : UFLA, 2008.
71 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.
Orientador: Luis David Solis Murgas.
Bibliografia.

1. Diluidores. 2. Volumes. 3. Inseminação intra-uterina. 4. Suínos. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 636.408245

ANA LUÍSA NEVES ALVARENGA

DILUIDORES E VOLUMES DE SÊMEN DESTINADOS À INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL INTRA-UTERINA EM SUÍNOS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração Fisiopatologia e Biotecnologia da Reprodução Animal, para obtenção do título de "Mestre".

APROVADA em 30 de janeiro de 2008.

Prof. Drª. Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida	ICB/UFMG
Prof. Dr. José Augusto de Freitas Lima	DZO/UFLA
Prof. Dr. Márcio Gilberto Zangeronimo	DMV/UFLA

Prof. Dr. Luis David Solis Murgas
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

A Deus, por ter iluminado meu caminho e me dado forças para chegar até aqui!

OFEREÇO

Aos meus pais, Marcelos e Suzete, que nunca mediram esforços para me fazer feliz. Pelo amor, incentivo e apoio em todos os momentos de minha vida. Vocês são muito importantes para mim!

A minha irmã, Marcella, pela torcida, pelo carinho e por sempre ter acreditado em mim. Conte sempre comigo!

Com muito carinho, ao Thadeu, que foi muito mais que um namorado: Companheiro, colega de trabalho, motorista, “psicólogo” e, acima de tudo, verdadeiro incentivador deste trabalho. Não teria conseguido sem você. Obrigada por tudo!

A minha mais nova família, Dita, Sr. Maurílio, Priscilla e Fábio, pelos momentos de alegria e pela torcida.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Medicina Veterinária, pela oportunidade de realização do Mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pelo apoio financeiro.

À Minitub do Brasil, pela fundamental colaboração e todo apoio dispensado.

Ao Prof. Dr. Luis David Solis Murgas, pessoa e profissional que muito admiro, pelos seis anos de convivência e orientação, pelos ensinamentos, pela amizade e pela força que tem me dado ao longo destes anos.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Márcio Gilberto Zangeronimo, que também me acompanha desde o início de minha caminhada, pela boa vontade e disponibilidade em ajudar sempre.

Aos membros da banca de avaliação, Profa. Dra. Fernanda Almeida e Prof. Dr. José Augusto de Freitas Lima, por terem se disponibilizado e aceito o convite para colaborar com este trabalho.

Ao José Pereira Leite, pela confiança e pela oportunidade de realizar este trabalho na Granja de Suínos da Fazenda São Paulo.

A todos os funcionários da Fazenda São Paulo, em especial aos funcionários do Laboratório e do Setor de Gestação, pela ajuda, pela amizade, pelo acolhimento e pelos ensinamentos de vida.

Aos funcionários Willian César Cortez e Marcos Antônio Machado, do Departamento de Medicina Veterinária, pela amizade e carinho.

Aos amigos Gilmara, Socorro, Daiane, Thais, Guilherme, Simone, Mariana e Viviane, pelo tempo compartilhado no Laboratório e, principalmente, fora dele.

Enfim, a todos que contribuíram para a minha formação e a Deus, sempre presente em todos os momentos de minha vida.

SUMÁRIO

RESUMO ..... **i**

ABSTRACT ..... **iii**

INTRODUÇÃO **1**

CAPÍTULO I **3**

REVISÃO DE LITERATURA **4**

1 Inseminação artificial: evolução e perspectivas 4
2 Diluentes de resfriamento do sêmen suíno 6
3 Inseminação artificial intra-uterina 9
4 Referências Bibliográficas 15

CAPÍTULO II **19**

CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS DO SÊMEN SUÍNO RESFRIADO EM DIFERENTES DILUENTES E VOLUMES DESTINADOS À INSEMINAÇÃO INTRA-UTERINA **19**

RESUMO 20
ABSTRACT 21
1 Introdução 22
2 Material e Métodos 24
3 Resultados e Discussão 28
4 Conclusões 42
5 Referências Bibliográficas 43

CAPÍTULO III **48**

DESEMPENHO REPRODUTIVO DE FÊMEAS SUINAS INSEMINADAS PELA TÉCNICA INTRA-UTERINA UTILIZANDO DOSES DE SÊMEN COM DIFERENTES VOLUMES E DILUENTES **48**

RESUMO 49
ABSTRACT 50
1 Introdução 51
2 Material e Métodos 52
3 Resultados e Discussão 56
4 Conclusões 65

5 Referências Bibliográficas 66
ANEXOS 68

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

TABELA 1. Composição dos diluentes Androstar, BTS e Merck III..... 26

TABELA 2. Médias de motilidade espermática (%) do sêmen suíno nos diferentes diluentes e volumes, durante os tempos de avaliação..... 29

TABELA 3. Médias de vigor espermático do sêmen suíno nos diferentes diluentes e volumes inseminantes, durante os tempos de avaliação..... 33

TABELA 4. Valores médios de alterações morfológicas espermáticas do sêmen suíno nos três diferentes diluentes e nos quatro volumes, durante os tempos de avaliação 0 e 48 horas..... 35

TABELA 5. Valores médios de espermatozóides vivos (%) avaliados no teste de viabilidade espermática do sêmen suíno nos três diferentes diluentes e nos quatro volumes, durante os tempos de avaliação 0 e 48 horas..... 36

TABELA 6. Valores percentuais médios de formas reativas (espermatozóides com membrana íntegra) obtidas pelo teste de resistência osmótica do sêmen suíno, nos três diferentes diluentes e nos quatro volumes, durante os tempos de avaliação 0 e 48 horas..... 38

TABELA 7. Taxas médias de degradação de motilidade espermática (%) do sêmen suíno nos três diferentes diluentes e nos quatro volumes, durante os tempos de avaliação 0, 24 e 48 horas..... 41

CAPÍTULO III

TABELA 1. Composição dos diluentes Androstar, BTS e Merck III..... 54

TABELA 2. Valores médios de taxa de parto e índice de retorno ao estro das fêmeas inseminadas intra-uterinamente, com doses de 15 e 30 mL diluídas em Androstar, BTS e Merck III..... 57

TABELA 3. Médias e erros-padrão do número total de leitões nascidos e número de leitões nascidos vivos de fêmeas inseminadas intra-uterinamente, com doses de 15 e 30 mL diluídas em Androstar, BTS e Merck III..... 59

TABELA 4. Médias e erros-padrão do número de leitões natimortos e mumificados presentes nas leitegadas das fêmeas inseminadas intra-uterinamente, com doses de 15 e 30 mL diluídas em Androstar, BTS e Merck III..... 62

TABELA 5. Médias e erros-padrão do peso da leitegada ao nascer (kg) das fêmeas inseminadas intra-uterinamente, com doses de 15 e 30 mL utilizando-se diferentes diluentes..... 64

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

FIGURA 1. Local de deposição do sêmen na inseminação artificial tradicional: cérvix..... 10

FIGURA 2. Local de deposição do sêmen na inseminação artificial intra-uterina: corpo ou cornos uterinos..... 12

CAPÍTULO II

FIGURA 1. Comportamento da motilidade do sêmen suíno diluído em Androstar, BTS e Merck III, durante os tempos de avaliação (0 hora, 24 e 48 horas)..... 31

FIGURA 2. Comportamento da motilidade do sêmen suíno nos diferentes volumes, durante os tempos de avaliação (0 hora, 24 e 48 horas)..... 32

FIGURA 3. Porcentagem média de espermatozóides reativos ao teste de resistência osmótica do sêmen suíno diluído nos diluentes Androstar, BTS e Merck III, durante os tempos de avaliação..... 39

CAPÍTULO III

FIGURA 1. Médias do número de leitões nascidos vivos de fêmeas inseminadas com doses de 15 e 30 mL, utilizando-se diferentes diluentes (Androstar, BTS e Merck III)..... 60

FIGURA 2. Médias do número total de leitões nascidos de fêmeas inseminadas com sêmen suíno diluído nos diluentes Androstar, BTS e Merck III, constituindo doses de 15 e 30 mL..... 61

RESUMO

ALVARENGA, Ana Luísa Neves. **Diluidores e volumes de sêmen destinados à inseminação artificial intra-uterina em suínos.** 2008. 71 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.[1]

Dois experimentos foram conduzidos com o objetivo de avaliar as características espermáticas de diferentes volumes de sêmen suíno, conservados em diferentes diluentes e analisar o desempenho reprodutivo de fêmeas suínas, em condições comerciais, após a inseminação artificial intra-uterina. No experimento 1, foram utilizados 12 ejaculados de 3 reprodutores suínos, diluídos em partes iguais, com os diluentes Androstar, BTS e Merck III nos volumes de 15, 20, 25 e 30 mL. As doses inseminantes, contendo 1,5 bilhão de espermatozóides cada, foram incubadas em geladeira, a 15ºC e avaliadas com relação à motilidade e ao vigor espermáticos, e teste de termorresistência no dia da coleta e nos tempos 24 e 48 horas após a coleta. A morfologia, o teste de resistência osmótica (TRO) e o teste de viabilidade espermática (porcentagem de espermatozóides vivos) foram realizados no dia da coleta e no tempo de 48 horas. Não foram observadas influências dos diluentes sobre a motilidade e vigor espermáticos após a diluição (0h). Às 24 horas, as amostras de sêmen diluídas em Androstar e BTS apresentaram motilidades semelhantes, porém, melhores em relação às amostras diluídas em Merck III ($P<0,05$). Quarenta e oito horas após a coleta, o Androstar foi o diluente que apresentou os maiores valores de motilidade ($P<0,05$). Com relação às demais variáveis, não foram encontradas diferenças entre os diluentes e os volumes inseminantes testados ($P>0,05$). Dessa forma, o Androstar preserva a qualidade do sêmen até 48 horas após a coleta e o BTS e o Merck III, até 24 horas, nos volumes de doses inseminantes entre 15 e 30 mL com 1,5 bilhão de espermatozóides. Para avaliação da fertilidade, 72 fêmeas suínas (ordem de parto de 2 a 5) foram inseminadas pela técnica de inseminação artificial intra-uterina. As doses inseminantes foram preparadas com os mesmos diluentes utilizados no experimento 1 (Androstar, BTS e Merck III), porém, utilizando-se somente os volumes de 15 e 30 mL. Foram analisados a taxa de parto, o índice de retorno ao estro, o número total de leitões nascidos, o número de leitões nascidos vivos, mumificados e natimortos e o peso da leitegada ao nascimento. Não foram observadas diferenças entre as taxas de parto e as taxas de retorno ao estro das fêmeas inseminadas ($P>0,05$). O percentual de fêmeas paridas variou de 75,00% a 91,70%. As maiores médias de número total de leitões nascidos,

[1] Comitê Orientador: Prof. Luis David Solis Murgas – UFLA (Orientador), Prof. Márcio Gilberto Zangeronimo– UFLA.

nascidos vivos e peso de leitegada ao nascimento foram de fêmeas inseminadas com doses diluídas em BTS e Merck III (P<0,05). Não houve diferenças entre os volumes inseminantes dentro dos diluentes BTS e Merck III em nenhuma das variáveis (P>0,05). Para o Androstar, o volume que proporcionou maior tamanho de leitegada e número de leitões nascidos vivos foi de 15 mL (P<0,05). Com relação ao número de natimortos e mumificados, os valores não diferiram (P>0,05) entre os diluentes e os volumes utilizados e estão dentro dos valores preconizados, tanto para natimortos quanto para mumificados. A inseminação intra-uterina de fêmeas suínas de ordem de parto dois a cinco, com doses inseminantes de 15 ou 30 mL diluídas em BTS ou Merck III, permite índices satisfatórios de desempenho reprodutivo. Em casos da utilização do diluente Androstar na inseminação intra-uterina, em detrimento dos diluentes de curta duração, recomenda-se a utilização de volume inseminante de 15 mL.

ABSTRACT

ALVARENGA, Ana Luísa Neves. **Diluents and semen volumes destined for swine intrauterine artificial insemination.** 2008. 71 p. Dissertation (Master in Veterinary Science) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.[1]

Two experiments were conducted with the objective of evaluating the spermatic characteristics of different volumes of swine semen conserved in different diluents and to analyze the reproductive performance of swine females, in commercial conditions, after the intrauterine artificial insemination. In the Experiment 1, twelve ejaculates from three boars, equally diluted in the Androstar, BTS and Merck III diluents were used to evaluate the characteristics of different semen volumes (15, 20, 25 and 30 mL) destined for intrauterine artificial insemination. The semen doses, containing 1.5 billion spermatozoids each, were incubated in the refrigerator at 15ºC and evaluated in relation to spermatic motility and vigor, and thermoresistance test on day of the collection and 24 and 48 hours afterwards. Spermatic morphology, osmotic resistance test (ORT) and spermatic viability test (alive spermatozoids percentage) were evaluated on day of collection and on 48 hours afterwards. The influences of the diluents were not observed on spermatic motility and vigor after dilution (0h). At 24 hours, the Androstar and the BTS presented similar motilities, but these values were significantly better in relation to Merck III ($P<0.05$). Forty eight hours after the collection, the Androstar presented the largest motility values ($P<0.05$). In relation to other variables, it did not found statistical differences between the diluents and the semen volumes tested ($P>0.05$). In that way, the Androstar preserves the semen quality until 48 hours after the collection and, the BTS and the Merck III until 24 hours, in the volumes between 15 and 30 mL of the semen doses with 1.5 billion of spermatozoids. For evaluation of the fertility, seventy two sows (two to five parities) were inseminated through the technique of intrauterine artificial insemination. The semen doses were prepared with the same diluents used in the experiment 1 (Androstar, BTS and Merck III), however the used volumes were only the volumes of 15 and 30 mL. The analyzed variables were farrowing rate, indexes of return to estrus, total number of piglets born, number of piglets born alive, mummified and stillborn piglets and litter weight at birth. It was not observe differences between the farrowing

[1] Guidance Committee: Prof. Luis David Solis Murgas - UFLA (Major Professor), Prof. Márcio Gilberto Zangeronimo – UFLA.

rates and the indexes of return to estrus of the inseminated females (P>0.05). The percentage of females that farrowed varied from 75.00% to 91.70%. The largest averages of total number of piglets born, number of piglets born alive and litter weight at birth were of females inseminated with semen doses diluted in BTS and Merck III (P<0.05). There were not differences among the semen volumes inside of the diluents BTS and Merck III for none of the variables (P>0.05). For Androstar, the volume that provided the largest litter size and number of piglets born alive was of 15 mL (P<0.05). In relation to the number of stillborn and mummified piglets, the values did not differ (P>0.05) between the used diluents and volumes and they are inside of the values extolled so for stillborn as to mummified. The intrauterine insemination of swine females of two to five parities, with semen doses of 15 and 30 mL diluted in BTS or Merck III allow satisfactory indexes of reproductive performance. In cases of using the diluent Androstar for intrauterine insemination, instead of the diluents of short duration, the use of semen volume of 15 mL is recommended.

INTRODUÇÃO

A carne suína vem sendo, desde 1978, quando superou a carne bovina em volume de produção, a principal fonte de proteína animal do mundo. Mantém, desde então, a liderança na produção, tendo alcançado, de acordo com dados da FAO (Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação), a cifra de 105 milhões de toneladas no ano de 2006.

O desenvolvimento da suinocultura brasileira, durante a última década, impulsionou significativamente a produção nacional de carne suína, tornando o país um dos maiores produtores mundiais. A atividade vem crescendo em qualidade e volume de produção, utilizando novas tecnologias e obtendo melhores índices zootécnicos.

Na suinocultura, o processo reprodutivo é de fundamental importância não só para a perpetuação da espécie mas, principalmente, por ser um fator decisivo no desempenho econômico da atividade. Não bastaria o emprego do melhoramento genético, da melhoria da nutrição, da ambiência e do aprimoramento das técnicas de manejo, se os índices referentes à reprodução não fossem também elevados.

Atualmente, cada vez mais se utiliza a inseminação artificial como um componente do manejo reprodutivo. Esta atividade corresponde a uma prática mais econômica que traz benefícios, tanto por meio do melhor aproveitamento de machos geneticamente superiores, quanto da rápida difusão de características desejáveis no rebanho, tais como melhor ganho de peso e conversão alimentar, melhor qualidade de carcaça e menor deposição de gordura.

Apesar de inúmeras vantagens, existem fatores que limitam a otimização desta técnica, como, por exemplo, a necessidade de pessoal qualificado, a exigência de um bom manejo geral e reprodutivo e a dificuldade de preservação

de sêmen suíno por períodos prolongados, sem alterar sua capacidade fecundante.

As vantagens no emprego desta biotécnica são tão evidentes que, apesar das limitações descritas, pode-se afirmar que, atualmente, a inseminação artificial em suínos representa uma tecnologia sólida, com aplicabilidade comercial que faz parte da rotina de produção de granjas tecnificadas.

Nos últimos 30 anos, poucas modificações foram feitas na realização da diluição e na técnica de inseminação propriamente dita. Porém, ocorreram progressos no desenvolvimento de novos equipamentos para a conservação do sêmen e a utilização de materiais descartáveis na produção das doses. Atualmente, o foco da pesquisa está direcionado à redução no número de espermatozóides e do volume por dose inseminante, a deposição do sêmen intra-uterinamente e a modulação da fagocitose das células espermáticas no trato genital feminino.

Na última década, os trabalhos e as pesquisas com inseminação artificial uterina confirmam a possibilidade de se reduzir o número de espermatozóides com a deposição da dose inseminante desde a bifurcação dos cornos uterinos (inseminação artificial intra-uterina) até próximo à junção útero-tubárica (inseminação artificial intra-uterina profunda).

Dessa forma, o presente trabalho foi conduzido com os objetivos de (1) avaliar as características espermáticas de reduzidos volumes de sêmen suíno conservado em diferentes diluentes e (2) analisar o desempenho reprodutivo de fêmeas suínas, em condições comerciais, após a inseminação artificial intra-uterina, utilizando estas doses inseminantes previamente testadas.

CAPÍTULO I

REVISÃO DE LITERATURA

1 Inseminação artificial: evolução e perspectivas

A inseminação artificial (IA) consolidou seu emprego comercial em várias espécies domésticas ao longo da segunda metade do século XX. Na espécie suína, teve seu início já em 1930, no Japão e na Rússia A partir daí, ocorreu uma evolução lenta e gradativa do seu uso em diferentes países, principalmente na Europa (Johnson, 1998).

Os primeiros relatos sobre inseminação artificial em suínos no Brasil datam no final de 1940, embora estas primeiras tentativas tenham sido apenas experimentais. Somente na década de 1970, período no qual começaram a ocorrer profundas mudanças na criação de suínos em nosso país, é que foram implantados os primeiros programas comerciais de IA (Bortolozzo & Wentz, 1995).

Nas décadas passadas, atenção considerável foi direcionada ao desenvolvimento de tecnologias reprodutivas. A inseminação artificial é um exemplo dessa biotécnica, que continua a ser expandida nos sistemas de produção de suínos (Day, 2000). De acordo com Rodriguez-Martinez et al. (2005), a utilização do sêmen do reprodutor suíno em programas de inseminação artificial triplicou nos últimos 17 anos.

Atualmente, a inseminação artificial suína é uma técnica reprodutiva de ampla aplicação em todo o mundo, ainda que o grau de utilização nos diversos países seja muito variável. Nos países europeus, em geral, a aplicação da inseminação artificial é muito elevada, chegando a taxas superiores a 80% em alguns países, como Holanda, França, Alemanha, Espanha, Noruega, Finlândia etc. (Mateos, 2003). Por outro lado, nos Estados Unidos, a porcentagem de utilização é ainda reduzida (cerca de 50%). Segundo Scheid & Silveira (2002), como, no Brasil, a grande parte da inseminação artificial em suínos desenvolve-se em sistemas internos, sem comercialização de sêmen e, conseqüentemente,

sem a necessidade de se reportar as atividades para órgãos de controle, inexistem estatísticas sobre o número real de matrizes inseminadas.

No mundo todo, estima-se que cerca de 24,1 milhões de fêmeas suínas sejam inseminadas anualmente, o que representa 48% do total de matrizes e uma produção de 152 milhões de doses de sêmen. Nos próximos anos, está prevista a adição de 10% a 20% no número de matrizes inseminadas, o que representaria um aumento de 6,6 a 12,7 milhões de fêmeas suínas a serem inseminadas e uma demanda anual de 42,7 a 83 milhões de doses de sêmen (Miglioranza, 2007).

Apesar da falta de levantamentos estatísticos oficiais que espelhem a realidade, observa-se que o emprego da inseminação artificial em suínos, no Brasil, tem aumentado consideravelmente, ano a ano, acompanhando o incremento do uso dessa biotécnica ocorrido mundialmente no mesmo período.

Na técnica tradicional de inseminação artificial suína, normalmente, se utiliza uma concentração de espermatozóides por dose de 3 a 5 bilhões, realizando de 2 a 3 inseminações por ciclo estral de cada fêmea. O sêmen é, normalmente, depositado na cérvix e o volume da dose inseminante varia de 80 a 100 mL (Williams, 2007).

A compreensão e a aceitação dos procedimentos para a preparação das doses inseminantes, juntamente com uma grande disponibilização de equipamentos por parte das indústrias associadas ao agronegócio da inseminação artificial, contribuíram para essa melhora significativa na qualidade das doses e com uma maior popularização desta tecnologia (Bortolozzo et al., 2005).

Segundo Grossfeld et al. (2005), a inseminação artificial é a maior tecnologia na qual são construídos os programas de criação animal. Esse vertiginoso aumento que vem ocorrendo na maioria dos países deve-se à elevação da demanda por carne suína de melhor qualidade e ao aumento da rentabilidade com carcaças com maior valor agregado, juntamente com a melhoria da técnica.

Gerrits et al. (2005) afirmam que as biotecnologias genéticas e moleculares facilitarão o desenvolvimento de animais transgênicos, sendo produzidos leitões com características desejadas e resistentes a doenças e a parasitas. No campo da biotecnologia da reprodução, a inseminação artificial foi a primeira tecnologia a ser utilizada e, apesar de hoje se falar muito em fertilização *in vitro*, transferência de embriões, sexagem, criopreservação de células espermáticas, injeção intracitoplasmática de espermatozóide, animais transgênicos e técnicas de clonagem, a inseminação artificial é o passo final para a consolidação de qualquer uma dessas biotecnologias.

Atualmente, tem sido possível a expansão da inseminação artificial na suinocultura em todo o mundo, com resultados de desempenhos reprodutivos cada vez mais consistentes. Se, por um lado, se podem esperar melhorias no rendimento e na economicidade da técnica com os avanços tecnológicos previstos para o futuro (IA com doses reduzidas, utilização de sêmen congelado), por outro lado, deve ser lembrado que a correta aplicação dos conhecimentos e recursos hoje disponíveis também oferece um potencial para a otimização do desempenho dessa técnica (Scheid & Silveira, 2002).

2 Diluentes de resfriamento do sêmen suíno

O sêmen suíno resfriado é o mais amplamente utilizado em inseminações artificiais. Em contraste com o sêmen bovino, o sêmen suíno congelado ainda apresenta fertilidade inferior à do sêmen resfriado, devido à perda de integridade de membrana durante o processo de congelamento e descongelamento (Paquignon et al., 1987). Para o armazenamento do sêmen suíno, dois fatores são muito importantes: a temperatura de armazenamento e a composição do meio diluidor (Johnson et al., 2000).

A necessidade de se desenvolverem novas tecnologias de preservação do sêmen suíno vem se destacando até os dias atuais, uma vez que ainda há uma limitação de tempo no qual o sêmen possa ser utilizado após a coleta.

Aproximadamente 25 milhões de inseminações artificiais são registrados no mundo, todos os anos. Mais de 99% dessas inseminações são realizadas com sêmen resfriado e usualmente armazenado na temperatura de 15°-20°C, por três dias (Johnson et al., 2000).

Para que o resfriamento de sêmen possa ser viabilizado, também é fundamental o desenvolvimento de diluentes capazes de permitir a sobrevivência espermática, mantendo elevada capacidade de fertilização.

Os elementos necessários à sobrevivência dos espermatozóides suínos ainda não são totalmente conhecidos. Sabe-se que, para conservar as células espermáticas por períodos prolongados, é necessário que se reduza a atividade metabólica dos espermatozóides, mediante a diluição em temperatura e em meio adequados (Mateos, 2003). Assim, ocorre uma redução significativa do consumo de energia e da formação de substâncias tóxicas, como o lactato, aumentando a longevidade dos espermatozóides (Althouse et al., 1998). Em outras palavras, a função básica do diluente é prolongar a viabilidade dos espermatozóides, fornecendo-lhes nutrientes e substâncias crioprotetoras ou fatores de resistência (Varner et al., 1987).

O diluente e a temperatura ideais capazes de oferecer maior longevidade aos espermatozóides ainda não são totalmente conhecidos, especialmente à baixas temperaturas.

A resistência dos espermatozóides ao choque térmico difere entre as várias espécies, sendo o espermatozóide suíno considerado um dos mais sensíveis (Bouchard et al., 1990). As diferenças parecem estar relacionadas à composição química e molecular das membranas plasmática e mitocondrial, especialmente os ácidos graxos e os fosfolipídios (Poulos et al., 1973). De

acordo com De Leeuw et al. (1990), o espermatozóide suíno, comparado ao espermatozóide bovino, possui menor proporção colesterol/fosfolipídio e uma distribuição assimétrica de colesterol dentro da membrana, tornando-a muito susceptível a temperaturas baixas. Estas características resultam em aumento de permeabilidade e redução na eficiência das enzimas homeostáticas e, conseqüentemente, influenciam a fertilidade subseqüente dos espermatozóides (Holt, 2000).

Conhecendo o fato de que, para poder fecundar o ovócito, os espermatozóides devem capacitar-se no trato genital da fêmea, e que a capacitação está associada com a fosforilação de tirosinas das proteínas espermáticas, pode-se dizer que a diluição seminal, em si, pode provocar modificações na fisiologia do espermatozóide, as quais poderiam reduzir sua capacidade fertilizante (Dubé et al., 2004).

Quanto maior o desconforto térmico, maior a percentagem de células lesadas, especialmente quando se usam diluentes salinos, como BTS, Kiew, Merck III, etc. O choque térmico causa perda de proteínas, redução de motilidade e do metabolismo e aumento de permeabilidade da membrana plasmática, acarretando desequilíbrio iônico (Watson, 1996).

Por esta razão, para realizar sua função, o diluidor deveria contribuir com os nutrientes necessários para a manutenção metabólica da célula espermática (glicose), o controle do pH do meio (bicarbonato, citrato de sódio, hidroxi-metil-amino-metano - TRIS), o controle da pressão osmótica (NaCl, KCl), a inibição do crescimento microbiano (antibióticos) e a proteção contra o choque térmico (Mateos, 2003).

Paquignon et al. (1987) assinalam que muitos diluentes têm sido usados com diferentes composições que induzem importantes variações em seus valores de pH e pressão osmótica. Em sua maioria, são diluentes de curta duração, como BTS e Kiew, quimicamente semelhantes e diferindo apenas na proporção básica

de seus componentes. Outros possuem macromoléculas e são considerados diluentes de longa ação (Androhep, Androstar, Zorlesco, etc.) permitindo a conservação por até seis a sete dias, a 16ºC. De forma geral, os diluidores de longa duração são mais onerosos economicamente que os de curta duração, devido à adição de componentes de alto preço, como BSA (*bovine serum albumin* ou albumina sérica bovina) e TRIS (Reed, 1990).

Acima de tudo, o bom desenvolvimento da inseminação artificial de suínos, a preparação do diluente, a conservação e a utilização do sêmen diluído devem implicar em atividades simples e viáveis para o produtor, com o tempo de conservação do sêmen suficiente para a execução da IA, devendo o diluente ser de baixo custo (Paquignon et al., 1987).

3 Inseminação artificial intra-uterina

As técnicas e as aplicações da inseminação artificial suína passaram por grande melhora desde a primeira técnica viável para inseminar fêmeas. A partir daí, pesquisas no transporte espermático, em marrãs e pluríparas inseminadas com doses diferindo em volume e número de espermatozóides, sugeriram que era necessária uma dose de cinco bilhões de espermatozóides em 100 mL de diluente, para se conseguir uma ótima taxa de fertilidade (Belstra, 2002).

Entre o final dos anos 1950 e o início dos anos 1960, surgiu a possibilidade de redução do volume e do número de espermatozóides na dose inseminante por meio da deposição do sêmen diretamente dentro dos cornos uterinos (Martinez et al., 2005).

O método tradicionalmente empregado na inseminação artificial em suínos preconiza a utilização de uma pipeta, que mimetiza a extremidade do pênis do cachaço, permitindo a deposição de sêmen no canal cervical (Bortolozzo et al., 2005).

Durante a inseminação convencional, a pipeta é introduzida, até ficar presa nos primeiros centímetros do colo do útero (Figura 1).

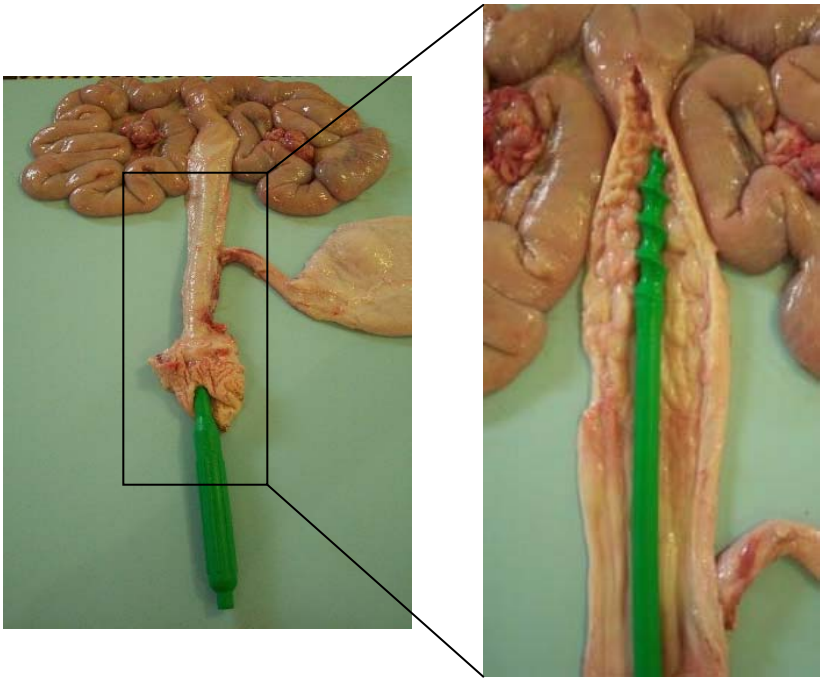

FIGURA 1. Local de deposição do sêmen na inseminação artificial tradicional: cérvix. Fonte: Adaptado de Roca et al. (2006).

Uma vez que o sêmen diluído é depositado na cérvix, ele tem que percorrer todo o comprimento da mesma até alcançar o corpo uterino. O transporte do sêmen, nesta parte do trato genital feminino, depende unicamente dos movimentos peristálticos e vê-se dificultado pela barreira física, que são os anéis cervicais. Quando as contrações ascendentes não são adequadas, são produzidos refluxos seminais, pelo qual grande quantidade de material seminal se perde (Williams, 2007).

No final do ano 1990, reiniciaram-se os estudos sobre a técnica de inseminação intra-uterina e a deposição do sêmen dentro do corpo ou corno

uterino, tanto de forma cirúrgica como não-cirúrgica, possibilitando a utilização de reduzido número de espermatozóides e volume, sem prejuízo do desempenho reprodutivo (Vazquez et al., 2003). A inseminação artificial cirúrgica garante a possibilidade de reduzir o número de espermatozóides com a deposição da dose inseminante próximo à junção útero-tubárica (Krueger et al., 1999; Krueger & Rath, 2000). Porém, como 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, de modo a possibilitar o uso de menores volumes e número de espermatozóides (Dallanora et al., 2004). Um deles é a inseminação artificial intra-uterina (IAIU).

Na IAIU, o cateter desliza pelo interior da pipeta tradicional, passa pela cérvix e é introduzido no útero até 20-25 cm no corpo ou corno uterino, como demonstrado na Figura 2 (Watson & Behan, 2002).

A vantagem desta técnica é a infusão de quantidades sensivelmente menores de espermatozóides no corpo do útero, já que a cérvix não representa uma barreira natural, existindo, assim, um menor número de barreiras mecânicas a serem vencidas durante o trânsito do espermatozóide até o oviduto (Watson & Behan, 2002). Dessa forma, são os espermatozóides capazes de conseguir os mesmos resultados reprodutivos que a inseminação intracervical convencional (Williams, 2007).

Segundo Gil et al. (2001), citados por Williams (2007), se pelo menos cinco milhões de espermatozóides estiverem presentes na junção útero-tubárica de cada corno, estes seriam suficientes para garantir níveis de fertilização adequados e leitegadas quantitativamente normais.

Os grandes benefícios da inseminação artificial intra-uterina podem ser resumidos em: redução do número total de espermatozóides por dose, redução do volume da dose inseminante (conseqüentemente, maior rapidez na realização da técnica), possibilidade de redução do número de doses/estro, maior número

de doses por ejaculado, redução do número de varrões e das instalações necessárias, redução do custo de compra e manutenção dos machos e maior aproveitamento dos reprodutores geneticamente superiores.

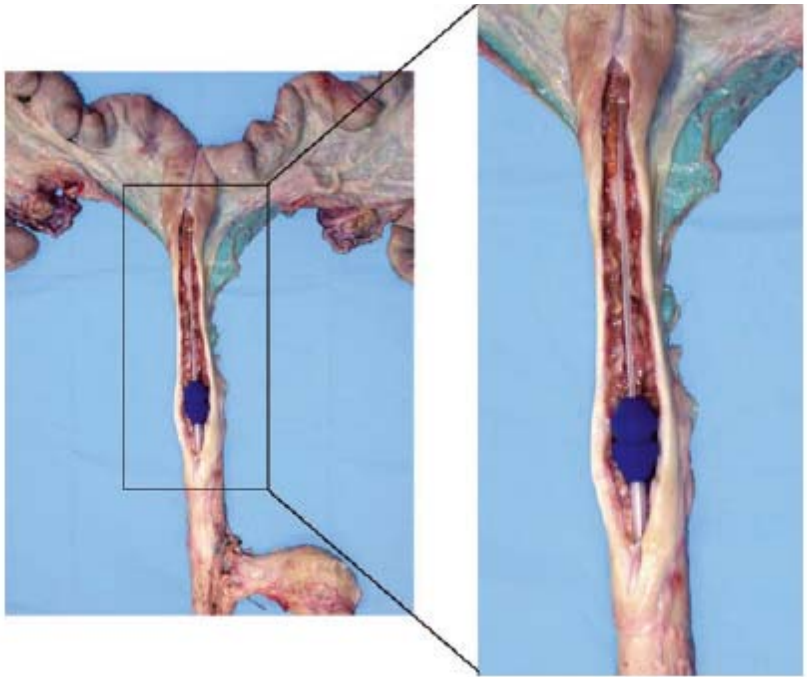

FIGURA 2. Local de deposição do sêmen na inseminação artificial intra-uterina: corpo ou cornos uterinos. Fonte: Adaptado de Roca et al. (2006)

No entanto, ao se implementar a técnica de inseminação artificial intra-uterina, algumas considerações têm que ser feitas, tais como a preparação de pessoal qualificado para o uso do cateter pós-cervical, cuidados com a introdução do cateter nas fêmeas, recomendação da não utilização da técnica em nulíparas e fêmeas de primeiro parto e assepsia redobrada, considerando que o cateter se introduz diretamente no corpo uterino (Williams, 2007).

Estudos empregando as duas técnicas de inseminação artificial com diferentes números de espermatozóides por dose demonstraram que é possível alcançar resultados semelhantes, empregando-se de 1 a 1,5 bilhão de espermatozóides por dose na inseminação intra-uterina, em substituição a 2 a 4 bilhões na inseminação artificial tradicional.

Gil et al. (2001), citados por Williams (2007), conseguiram excelentes resultados na inseminação intra-uterina utilizando doses de 500 milhões e 750 milhões de espermatozóides. Porém, sugeriram a utilização de doses com um bilhão de espermatozóides em aproximadamente 30 mL, a fim de se obter uma margem de segurança.

Com relação aos volumes a serem utilizados na inseminação artificial intra-uterina, estes também têm sido testados, porém ainda não se definiu qual volume gera melhor comportamento espermático. As reduções no número de espermatozóides e no volume das doses inseminantes necessitam de mais estudos, para que valores mínimos sejam definidos a ponto de serem utilizáveis com bons resultados (Mezalira et al., 2007). No entanto, a utilização de pequenos volumes requer cuidados redobrados com a temperatura de todos os materiais que entram em contato com o sêmen, a temperatura de diluição, a qualidade e a procedência do diluidor (Bortolozzo et al., 2005).

A considerável redução no volume total das doses permitirá uma economia na quantidade de diluente consumido. Essa economia poderá ser direcionada à aquisição de diluentes de melhor qualidade, destinados a maiores períodos de armazenamento (diluentes de longa duração).

As expectativas oriundas das pesquisas já realizadas, e também daquelas ainda em andamento, apontam para uma ampliação no uso da inseminação artificial intra-uterina com sêmen resfriado, otimizando, assim, os resultados com a estrutura já instalada, sem maiores investimentos. Tal tecnologia também

incrementará a utilização do sêmen sexado ou congelado e, possivelmente, a transferência de embriões (Vasquez et al., 2005).

4 Referências Bibliográficas

ALTHOUSE, C.G.; WILSON, M.E.; KUSTER, C.; PARSLEY, M. Characterization of lower temperature storage limitations of fresh-extended porcine semen. **Theriogenology**, v.50, p.535-543, 1998.

BELSTRA, B.A. Review: intrauterine (transcervical) and fixed-time artificial insemination in swine. **Annual Swine Report,** 2002. Disponível em: <http://mark.asci.ncsu.edu/SwineReports/ 2002/belstra3.htm> Acesso em: 25 abr. 2007.

BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I. Fatores que interferem nos resultados de inseminação artificial em suínos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11., 1995, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: CBRA, 1995. p.131-141.

BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I.; DALLANORA, D. Situação atual da inseminação artificial em suínos. **Acta Scientiae Veterinariae,** Porto Alegre, v.33, n.1, p.17-32, 2005.

BOUCHARD, G.F.; MORRIS, J.K.; SIKES, J.D. Effect of storage temperatures, cooling rates and two differents semen extenders on canine spermatozoal motility. **Theriogenology**, Missouri, v.34, n.1, p.147-157, 1990.

DALLANORA, D. **Desempenho reprodutivo de fêmeas suínas após a inseminação artificial intra-uterina ou tradicional.** 2004. 53f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

DAY, B.N. Reproductive biotechnologies: current status in porcine reproduction. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.60, p.161-172, July 2000. Supplement.

DE LEEUW, F.; COLENBRANDER, B.; VERKLEIJ, A. The role membrane damage plays in cold shock and freezing injury. **Reproduction in Domestic Animals**, p.95-104, 1990. Supplement 1.

DUBÉ, C.; BEAULIEU, M.; REYES-MORENO, C.; GUILLEMETTE, C.; BAILEY, J.L. Boar sperm storage capacity of BTS and Androhep Plus: viability, motility, capacitation, and thyrosine phosphorylation. **Theriogenology**, v.62, p.874-886, 2004.

GERRITS, R.J.; LUNNEY, J.K.; JOHNSON, L.A.; PURSEL, V.G.; KRAELING, R.R.; ROHRER, G.A.; DOBRINSKY, J.R. Perspectives for artificial insemination and genomics to improve global swine populations. **Theriogenology**, Woburn, v.63, n.2, p.283-299, Jan. 2005.

GROSSFELD, R.; KLINC, P.; SIEG, B.; RATH, D. Production of piglets with sexed semen employing a non-surgical insemination technique. **Theriogenology**, Woburn, v.63, n.8, p.2269-2277, May 2005.

HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v.57, p.47-58, 2000.

JOHNSON, L.A. Current developments in swine semen: preservation, artificial insemination and sperm sexing. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY, 15., 1998, Birmingham. **Proceedings…** Birmingham: IPVS, 1998. p.225.

JOHNSON, L.A.; WEITZE, K.F.; FISER, P.; MAXWELL, W.M.C. Storage of boar semen. **Animal Reproduction Science,** Amsterdam, v.62, n.1/3, p.143-172, Aug. 2000.

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.

MATEOS, J.G. Los diluyentes de inseminación artificial porcina. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v.1, n.2, p.17-27, 2003.

MARTINEZ, E.A.; VAZQUEZ, J.M.; ROCA, J.; CUELLO, C.; GIL, M.A.; PARRILLA, I.; VAZQUEZ, J.L.; DAY, B.N. An update on reproductive technologies with potencial short-term application in pig production. **Reproduction in Domestic Animals,** Oxford, v.40, n.4, p.300-309, 2005.

MEZALIRA, A.; DALLANORA, D.; SCHMIDT, A.; ZILLI, R.; BERNARDI, M.; WENTZ, I.; BORTOLOZZO, F.P. **Inseminação intra-uterina em suínos com redução no volume e número de espermatozóides**. Disponível em: <http://www.suinoculturaem foco.com.br/fd/reproducao10_1.php. Acesso em: 25 abr. 2007.

MIGLIORANZA, N. **Inseminação Artificial –** uma tecnologia cada vez mais utilizada. Disponível em: <http://www.apcs.com.br/7,1,26,14615.asp>. Acesso em: 05 nov. 2007.

PAQUIGNON, M.; BUSSIERE, J.; BARITEAU, F. Resultats recents en matiere de technologie de la conservation de la semence de verrat. **Journées de la Recherche Porcine en France**, v.19, p.63-78, 1987.

POULOS, A.; DARIN-BENNETT, A.; WHITE, I.G. The phospholipid-bound fatty acids and aldehyds of mammalian spermatozoa. **Comparative Biochemistry and Phisiology**, v.4613, p.541-549, 1973.

REED, H.C.B. Commercial requirements for an effective fresh semen diluited. **Reproduction in Domestic Animals**, v.1, p.255-270, 1990. Supplement.

ROCA, J.; VAZQUEZ, J.M.; GIL, M.A.; CUELLO, C.; PARRILLA, I.; MARTINEZ, E.A. Challenges in pig artificial insemination. **Reproduction Domestic Animal,** Oxford, v.42, n.2, p.43-53, Oct. 2006.

RODRIGUEZ-MARTÍNEZ, H.; SARAVIA, F.; WALLGREN, M.; TIENTHAI, P.; JOHANNISSON, A.; VÁZQUEZ, J.; MARTÍNEZ, E.; ROCA, J.; SANZ, L.; CALVETE, J. Boar spermatozoa in the oviduct. **Theriogenology**, Woburn, v. 63, n. 2, p. 514-535, Jan. 2005.

SCHEID, I.R.; SILVEIRA, P.R. Uma análise da IA na suinocultura brasileira. **Suínos & Cia**, Campinas, v.1, n.1, p.25-28, nov./dez. 2002.

VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L.; LOVE, C.L; GARCIA, M.C.; KENNEY, R.M. Effects of semen fractionation and dilution ratio on equine spermatozoal motility parameters. **Theriogenology**, v.28, p.709-723, 1987.

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,** Woburn, v.59, n.7, p.1605-1614, Apr. 2003.

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

WATSON, P.F. Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 32, p.135-140, 1996.

WATSON, P.F.; BEHAN, J.R. Intrauterine insemination of sows with reduced sperm numbers: results of a commercially based field trial. **Theriogenology,** Woburn, v.57, n.6, p.1683-1693, Apr. 2002.

WILLIAMS, S. **Inseminación artificial post cervical**. Porcicultura.com. Disponível em: <http://www.porcinocultura.com>. Acesso em: 25 abr. 2007.

CAPÍTULO II

CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS DO SÊMEN SUÍNO RESFRIADO EM DIFERENTES DILUENTES E VOLUMES DESTINADOS À INSEMINAÇÃO INTRA-UTERINA

RESUMO

Foram utilizados 12 ejaculados de três reprodutores suínos, diluídos em partes iguais, com os diluentes Androstar, BTS e Merck III, para avaliar as características espermáticas em diferentes volumes inseminantes (15, 20, 25 e 30 mL) destinados à inseminação artificial intra-uterina. As doses contendo 1,5 bilhão de espermatozóides cada foram incubadas em geladeira, a 15ºC e avaliadas com relação à motilidade e ao vigor espermáticos, e teste de termorresistência no dia da coleta e nos tempos de 24 e 48 horas após a coleta. A morfologia, o teste de resistência osmótica (TRO) e o teste de viabilidade espermática (porcentagem de espermatozóides vivos) foram realizados no dia da coleta e no tempo de 48 horas. O modelo estatístico foi o de blocos ao acaso com parcela subdividida no tempo, em esquema fatorial 3 x 4 + 1 (três diluentes, quatro volumes de armazenamento e um tratamento adicional – avaliação do sêmen *in natura*) nas parcelas e, nas subparcelas, os tempos de avaliação (0, 24 e 48 horas). Não foram observadas influências iniciais dos diluentes sobre a motilidade e o vigor espermáticos no dia da coleta (0h). Às 24 horas, o Androstar e o BTS apresentaram motilidades semelhantes, porém, melhores em relação ao Merck III ($P<0,05$). Quarenta e oito horas após a coleta, o Androstar foi o que apresentou os maiores valores de motilidade ($P<0,05$). Com relação às demais variáveis, não foram encontradas diferenças entre os diluentes e os volumes inseminantes testados ($P>0,05$). Dessa forma, o Androstar preserva a qualidade do sêmen até 48 horas após a coleta e o BTS e o Merck III até 24 horas, nos volumes de doses inseminantes entre 15 e 30 mL com 1,5 bilhão de espermatozóides.

Palavras-chave: Androstar, BTS, Merck, reprodução, suínos

SPERMATIC CHARACTERISTICS OF SWINE SEMEN COOLED IN DIFFERENT DILUENTS AND VOLUMES DESTINED FOR INTRAUTERINE INSEMINATION

Abstract – Twelve ejaculates from three boars, equally diluted in the Androstar, BTS and Merck III diluents were used to evaluate the characteristics of different semen volumes (15, 20, 25 and 30 mL) destined for intrauterine artificial insemination. The semen doses, containing 1.5 billion spermatozoids each, were incubated in the refrigerator at 15ºC and evaluated in relation to spermatic motility and vigor, and thermoresistance test on day of the collection and 24 and 48 hours afterwards. Spermatic morphology, osmotic resistance test (ORT) and spermatic viability test (alive spermatozoids percentage) were evaluated on day of collection and 48 hours afterwards. The statistical design was randomized complete block with subdivided parcel in the time, in factorial scheme 3 x 4 + 1 (three diluents, four storage volumes and an additional treatment - evaluation of the semen *in natura*) in the parcels and, in the sub parcels, the times of evaluation (0, 24 and 48 hours). The influences of the diluents were not observed on spermatic motility and vigor after dilution (0h). At 24 hours, the Androstar and the BTS presented similar motilities, but these values were significantly better in relation to Merck III ($P<0.05$). Forty eight hours after the collection, the Androstar presented the largest motility values ($P<0.05$). In relation to other variables, it did not found statistical differences between the diluents and the semen volumes tested ($P>0.05$). In that way, the Androstar preserves the semen quality until 48 hours after the collection and, the BTS and the Merck III until 24 hours, in the volumes between 15 and 30 mL of the semen dosis with 1.5 billion of spermatozoids.

Keywords: Androstar, BTS, Merck, reproduction, swine

1 Introdução

Atualmente, cada vez mais se utiliza a inseminação artificial como um componente do manejo reprodutivo em suínos. Tradicionalmente, a técnica preconiza a utilização de uma dose inseminante com três bilhões de espermatozóides, em um volume de 80 a 100 mL (Bortolozzo et al., 2003). Buscando a redução do volume e do número de espermatozóides por dose, estão sendo propostas modificações na técnica, as quais se baseiam na deposição dos espermatozóides diretamente no útero.

Na inseminação intra-uterina, o cateter desliza pelo interior da pipeta tradicional, passa pela cérvix e é introduzido no útero até 20-25 cm no corpo ou corno uterino. Essa tecnologia permite o emprego de doses com 1 bilhão de espermatozóides, em um volume total de 50-60 mL, o que corresponde a 1/3 do total de células empregadas nas doses com a técnica tradicional e uma redução de 25%-30% no volume de diluente consumido pela central (Watson & Behan, 2002).

O aperfeiçoamento desta técnica e a sua validação a campo são de extrema importância devido aos benefícios econômicos que a redução do número de espermatozóides em até mais de 50% e a redução do volume de diluente utilizado podem trazer (Dallanora et al., 2004). No entanto, a redução desses números pode requerer um novo método de conservação e, conseqüentemente, serão necessários estudos acerca dos melhores e mais adequados diluentes para esta técnica (Rath, 2002).

A diluição de pequenos volumes implica em cuidados redobrados e em qualidade e procedência do diluente. Portanto, o sucesso da técnica de inseminação está associado à capacidade do diluente em conservar os espermatozóides em condições adequadas durante a estocagem (Johnson et al., 1982) e à preservação das qualidades fecundantes do sêmen diluído por maior

período de tempo possível, a fim de otimizar o uso do sêmen, melhorar o manejo e causar menor desgaste aos reprodutores (Paquignon et al., 1987).

Várias formulações de diluentes foram testadas, sendo o BTS (*Beltsville Thawing Solution*), por seu baixo custo, o de eleição na técnica de inseminação artificial (Woelders, 1992). Segundo Bortolozzo et al. (2005), a considerável redução no volume total das doses destinadas à inseminação intra-uterina permitirá a economia na quantidade de diluente a ser consumido. Sendo assim, essa economia pode ser direcionada à aquisição de produtos de melhor qualidade, destinados a maiores períodos de armazenamento (diluentes de longa duração).

Em outro sentido, as técnicas laboratoriais de análise de sêmen realizadas previamente à técnica de inseminação, seja tradicional ou intra-uterina, são de fundamental importância para averiguar a qualidade espermática e constituem ferramentas essenciais para estimar a capacidade de fertilização do ejaculado (Vyt, 2007). A motilidade espermática é indicativa de um metabolismo ativo, considerado de grande importância no momento de fertilização (Johnson et al., 2000), enquanto que a morfologia dos espermatozóides pode indicar a viabilidade espermática, também essencial na fertilização (Vyt, 2007).

Frente às diferentes respostas quanto ao comportamento do sêmen suíno resfriado, realizou-se este trabalho com a finalidade de avaliar a qualidade espermática utilizando diferentes diluentes e volumes seminais de doses destinadas à inseminação intra-uterina.

2 Material e Métodos

O experimento foi realizado em uma granja comercial, com produção de suínos em ciclo completo, pertencente à Fazenda São Paulo, no município de Oliveira, MG, entre os meses de janeiro a julho de 2007.

Para a realização do trabalho experimental, foram utilizados três reprodutores suínos de genética Agroceres PIC (linhagem 337TGSUP), de fertilidade previamente comprovada, com idade média de 10 meses. Os machos foram mantidos em baias individuais (5 m^2), sendo alimentados com ração para reprodutores (EM = 3.170 kcal/kg e 15,84% de proteína bruta), recebendo 3,0 kg, com freqüência de dois arraçoamentos por dia.

A coleta do sêmen foi realizada pelo método da mão enluvada (King & Macpherson, 1973), com auxílio de um manequim, sendo realizadas quatro coletas por animal, totalizando, portanto, 12 coletas. O intervalo das coletas para cada macho foi de 3 a 4 dias. Antes de se realizar a coleta, procedeu-se a lavagem com água e a posterior secagem com papel-toalha do prepúcio, para a retirada da urina, de sujidades e debris celulares acumulados no divertículo prepucial. O ejaculado foi coletado em frasco de 500mL, pré-aquecido a 37°C, protegido por recipiente isotérmico e com filtro de disco (Hygia Favorit II®, Ø: 230 mm), para a separação da fração gel do sêmen.

O sêmen foi levado ao Laboratório da própria Fazenda, sendo mantido em banho-maria a 37ºC, para que fossem realizadas avaliações do sêmen *in natura* (volume, aspecto, motilidade, vigor, concentração e morfologia espermáticas). Os outros materiais a serem utilizados também foram mantidos a 37ºC, em banho-maria ou sobre placa aquecedora.

O volume foi determinado diretamente pela leitura no recipiente e o aspecto foi determinado visualmente, sendo aceito como normal o aspecto branco leitoso. A motilidade e o vigor foram avaliados em triplicata, por meio do exame de uma gota de sêmen colocada entre lâmina e lamínula pré-

aquecidas, em microscopia óptica (aumento de 40 vezes), segundo metodologia proposta por Scheid (1993). A motilidade foi expressa em percentual de células móveis da amostra (0 a 100). Para o vigor, foram atribuídos valores de 1 a 5 pontos, dos quais os mais elevados indicavam os espermatozóides mais vigorosos. A concentração espermática foi obtida utilizando-se a câmara de Neubauer, com sêmen diluído na proporção de 1:100 (sêmen:formol citrato). A contagem espermática, na câmara de Neubauer, foi feita em microscópio de contraste de fase (aumento de 40 vezes), com o resultado expresso em número de células/mm^3 de sêmen (Martin Rillo et al., 1996). Para a verificação de anormalidades espermáticas, foi utilizado 1 ml de formol citrato, ao qual foram adicionadas gotas de sêmen até a turvação da solução. Desta solução, homogeneizada, elaborou-se a preparação úmida sem corante, para leitura das alterações morfológicas dos espermatozóides, em microscópio de contraste de fase com aumento de 1.000 vezes, por meio da contagem diferencial de 100 células (Scheid, 1993).

Após as avaliações *in natura*, o volume total do ejaculado foi fracionado em três partes iguais e cada uma foi diluída na proporção de 1:1, com cada um dos três diluentes utilizados e novamente foram analisados a motilidade e o vigor espermáticos. As composições dos diluentes Androstar, Beltsville Thawing Solution (BTS) e Merck III estão descritas na Tabela 1.

Após a diluição, foram retiradas quatro alíquotas correspondentes a 1,5 bilhão de espermatozóides de cada uma das três frações. O número total de células espermáticas de 1,5 bilhão foi obtido calculando-se, por regra de três, o volume do ejaculado a ser transferido para cada frasco, por meio da multiplicação do volume total do ejaculado diluído por 1,5 bilhão, seguida da divisão deste resultado pelo número total de espermatozóides no ejaculado. Cada alíquota foi transferida para uma garrafa plástica de 100 mL. Posteriormente, foram acrescentados os respectivos diluentes, a fim de se obter volumes finais de

15, 20, 25 e 30 mL. Portanto, para cada uma das três frações de ejaculado diluído com um diluente específico, foram obtidos quatro frascos com volumes diferentes, totalizando 12 tratamentos (três diluentes x quatro volumes). Foi realizada uma contraprova para aferir a concentração de cada dose produzida por meio de um aparelho de espectrofotômetro.

TABELA 1. Composição dos diluentes Androstar, BTS e Merck III

Produto	Androstar[*1]	BTS[*2]	Merck III[*2]
Glicose (g)	66,25	79,90	89,20
Citrato de sódio (g)	11,00	12,71	3,05
Bicarbonato de sódio (g)	13,50	2,65	4,20
EDTA[3] (g)	6,50	2,65	3,05
TRIS[4] (g)	2,00	-	-
Cloreto de potássio (g)	-	1,59	-
Sulfato de Gentamicina (g)	0,75	0,59	0.50
Água deionizada (l)	1,00	1,00	1,00
Osmolaridade (mOsm)	309	330	340
pH	7,20	7,20	6,80

[*]Diluentes fabricados pela Minitüb Abfüll-und Labortechnik Gmbh & Co. KG. e importados e distribuídos pela Minitüb do Brasil; Valores para cada 100 g de diluente. [1]Diluente considerado de longa-duração (período de conservação superior a três dias); [2]Diluentes considerados de curta-duração (período de conservação por até três dias); [3]EDTA: Etilenodiamino tetracetato; [4]TRIS: Hidroxi-metil-amino-metano.

Os frascos permaneceram em repouso, em temperatura ambiente, por duas horas, protegidos da luz. Posteriormente, foram incubados em geladeira, com temperatura de 15ºC a 18ºC e avaliados no dia da coleta e nos tempos de 24 e 48 horas após a coleta. Os parâmetros avaliados e os testes realizados foram: motilidade e vigor espermáticos, teste de termorresistência (TTR), morfologia espermática, teste de resistência osmótica (TRO) e viabilidade espermática.

No dia da coleta e nos tempos de 24 e 48 horas, foram avaliados a motilidade e o vigor espermáticos e o teste de termorresistência. Para a análise de motilidade e vigor, foram retiradas alíquotas de 2 mL de cada um dos 12 frascos e transferidos para 12 tubos correspondentes. Antes de cada leitura, os tubos foram incubados, em banho-maria, a 37ºC, sendo a leitura realizada após 10 minutos de incubação. O teste de termorresistência consistiu na incubação de 2 mL de sêmen, a 37ºC, por um período de 2 horas. Durante este período teve seu vigor avaliado aos 5 minutos e aos 120 minutos de incubação. Foi aplicada a seguinte fórmula matemática, para que fosse calculada a taxa de degradação da motilidade (TDM) = (vigor aos 5 minutos – vigor aos 120minutos)/(vigor aos 5 minutos) x 100 (Salgueiro et al., 2003a).

A morfologia, o teste de resistência osmótica e o teste de viabilidade espermática (porcentagem de espermatozóides vivos) foram realizados no dia da coleta e no tempo de 48 horas. Na análise morfológica, foram avaliadas as alterações espermáticas de cabeça, de cauda e do total de alterações. Para a realização do TRO, foram adicionados 100µL de sêmen em 1 mL de solução de 100 mOs/L de água (2 partes de água destilada:1 parte de diluente), incubada por 30 minutos, a 37ºC. Foram contadas 100 células no aumento de 1.000 vezes em microscopia de contraste de fase e o cálculo de formas reativas seguiu a fórmula, segundo Melo & Henry (1999): RO (resistência osmótica) = (% de alterações na região da cauda após teste RO) - (% de alterações na região da cauda antes do teste RO). Para o teste de viabilidade espermática, misturou-se uma gota de corante eosina-nigrosina com uma gota de sêmen diluído. Em seguida, elaborou-se um esfregaço em lâmina sob placa aquecedora. Posteriormente, foi examinado ao microscópio com objetiva de 40 vezes para, em um total de 100 células, identificar os espermatozóides vivos (aparecendo sem coloração) e os mortos (absorveram o corante e se tornaram róseos), segundo metodologia de Mies Filho (1982).

Para a análise dos dados, foi utilizado um delineamento em blocos ao acaso, com parcela subdividida no tempo, em esquema fatorial 3 x 4 + 1 (três diluentes, quatro volumes de armazenamento e um tratamento adicional – avaliação do sêmen *in natura*) nas parcelas e, nas subparcelas, os tempos de avaliação (0, 24 e 48 horas). Os blocos foram constituídos pelos ejaculados. A parcela experimental foi constituída por uma dose inseminante.

Foram avaliados a motilidade e o vigor espermáticos, a TDM, a porcentagem de espermatozóides vivos, a porcentagem de células reativas ao TRO, a porcentagem de cabeça e de cauda anômalas, e o total de alterações morfológicas. Os dados de motilidade foram submetidos à análise de variância, sendo os efeitos dos diluentes, dos volumes e da interação diluente x volume avaliados pelo teste F. A análise de regressão foi utilizada para a variável volume, quando o resultado do teste foi significativo a 5%. As demais variáveis foram submetidas à análise não paramétrica, visto que os dados não atingiram a normalidade, mesmo após a transformação dos mesmos. Neste caso, as médias foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis quando houve significância ao teste qui-quadrado ($P<0,05$).

Todas as análises foram realizadas utilizando-se o Sistema de Análise Estatística e Genética da Universidade Federal de Viçosa (SAEG, 1993).

3 Resultados e Discussão

Os resultados referentes à motilidade espermática estão apresentados na Tabela 2.

No dia da coleta (0 hora), todos os tratamentos (3 diluentes x 4 volumes) apresentaram motilidades espermáticas semelhantes à motilidade do sêmen *in natura*. Isso já era esperado, já que, durante o armazenamento *in vitro* do sêmen suíno, a queda na motilidade espermática ocorre de forma gradativa, independente do diluente e do volume utilizados no processamento do sêmen

(Paulenz et al., 2000). Entretanto, segundo Harrison et al. (1978), citados por Kommisrud et al. (2002), só o fato de transferir as células espermáticas do plasma seminal para os meios diluentes artificiais em si já é capaz de reduzir a motilidade e aumentar a aglutinação espermática.

TABELA 2. Médias de motilidade espermática (%) do sêmen suíno nos diferentes diluentes e volumes, durante os tempos de avaliação

Tempo (h)	Diluente	Volume (mL)				Média[1]
		15	20	25	30	
0	Androstar	91,30	91,30	88,80	87,50	89,70
	BTS	89,60	90,40	89,30	87,10	89,10
	Merck III	89,60	91,30	86,30	87,50	88,60
	Média	90,10	91,00	88,10	87,40	P = 83,23
24	Androstar	81,80	81,10	80,00	83,20	81,50 **a**
	BTS	76,80 *	76,40 *	77,30 *	83,20	78,40 **a**
	Merck III	70,50*	73,30 *	71,40 *	67,40 *	70,70 **b**
	Média	76,40	76,90	76,20	77,90	P = 0,00
48	Androstar	65,80 *	64,60 *	70,40 *	70,00 *	67,70 **a**
	BTS	59,20 *	61,70 *	57,10 *	65,80 *	60,90 **b**
	Merck III	61,70 *	61,70 *	52,90 *	50,40 *	56,70 **b**
	Média	62,20	62,60	60,10	62,10	P = 0,00
Sêmen *in natura* (controle)		92,90				
CV 1 (%)		12,37				
CV 2 (%)		10,64				

* Diferem do tratamento controle pelo teste Dunnett (P<0,05)
[1]Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem pelo teste de Tukey (P<0,05)

Após 24 horas, todos os volumes diluídos com Androstar (15, 20, 25 e 30 mL) preservaram a motilidade espermática do sêmen *in natura*. Isto pode ser explicado pelo fato de o Androstar, considerado um diluente de longa duração e, portanto, de melhor qualidade que o BTS e o Merck III, possuir alguns de seus componentes como o EDTA, o bicarbonato de sódio e o sulfato de gentamicina, em quantidades maiores em relação à formulação dos demais diluentes. Além

disso, o Androstar possui um agente tamponante (TRIS), inexistente na composição dos diluentes salinos, o que pode ter evitado a queda do pH e, conseqüentemente, a redução do metabolismo celular espermático.

Dentre os volumes diluídos em BTS, apenas o volume de 30 mL preservou a motilidade espermática 24 horas após a coleta. Este fato pode estar associado à presença de maior quantidade de plasma seminal nas doses contendo 30 mL em relação às doses com volumes inferiores. Considerando que, quando a concentração espermática aumenta, a quantidade de plasma seminal por espermatozóide diminui, Kuster & Althouse (1999) sugeriram que existe um efeito positivo do aumento da quantidade de plasma seminal sobre a manutenção da motilidade espermática, o que pôde ser observado neste trabalho. Este efeito positivo do plasma seminal também foi observado por Garner et al. (2001) sobre a motilidade de espermatozóides bovinos.

Além disso, não se pode ignorar o fato de que o cloreto de potássio presente na composição do BTS, em detrimento da composição dos demais diluentes, previne a perda de potássio de dentro das células, evitando a perda de motilidade devido à ineficácia da bomba sódio-potássio (Alvarez & Storey, 1982). Este fato pode ter auxiliado a manutenção da motilidade *in natura* nas doses contendo 30 mL do diluente BTS.

Por outro lado, 48 horas após a coleta, as motilidades de todos os tratamentos foram estatisticamente menores em relação ao sêmen *in natura* ($P<0,05$). Alexopoulos et al. (1996) também observaram reduções significativas da motilidade em doses de sêmen suíno contendo desde 1 bilhão a 5 bilhões de espermatozóides em 100 mL de BTS, a partir de 48 horas.

De modo geral, pode-se dizer que os volumes inseminantes diluídos em todos os meios diluentes apresentaram decréscimo progressivo da motilidade espermática, no decorrer dos dias de avaliação.

O efeito isolado dos diluentes sobre a motilidade espermática, nos tempos de avaliação deste experimento, está ilustrado na Figura 1.

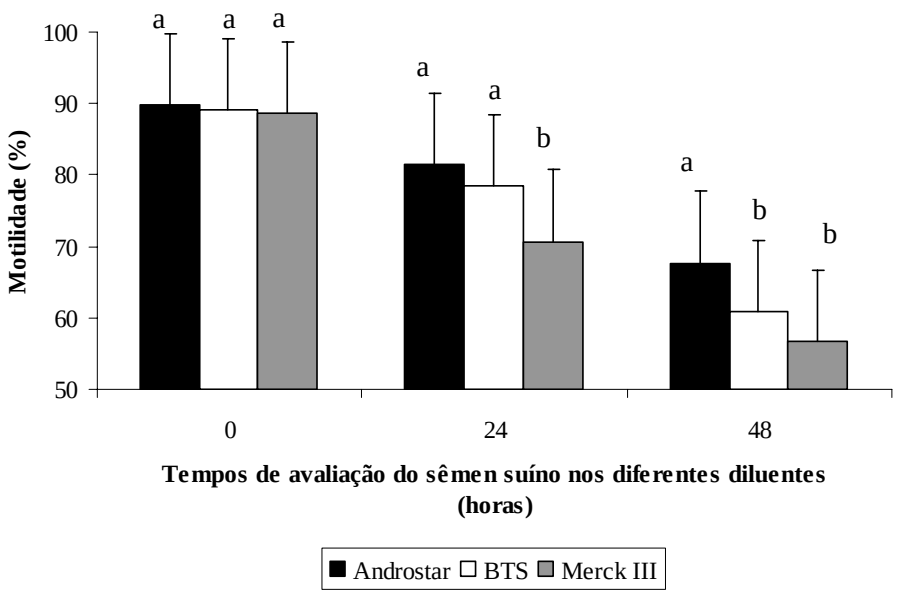

FIGURA 1. Comportamento da motilidade do sêmen suíno diluído em Androstar, BTS e Merck III, durante os tempos de avaliação (0 hora, 24 e 48 horas). [a,b]Letras diferentes no mesmo tempo de avaliação implicam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey (P<0,05)

Não foram observadas diferenças, entre os diluentes, quanto à motilidade espermática no dia da coleta (0 hora).

No tempo de 24 horas, as amostras de sêmen diluídas em Androstar e BTS apresentaram motilidades semelhantes, porém, significativamente melhores em relação às amostras seminais diluídas em Merck III (P<0,05). Estes dados corroboram com os resultados obtidos por Kotzias-Bandeira (1999), segundo os quais as amostras de sêmen suíno diluídas em Androhep (diluente de longa duração) e BTS apresentaram maiores motilidades em relação ao sêmen diluído em Merck III (P<0,05). Outros autores encontraram maior taxa de sobrevivência

espermática (medida através da motilidade) ao utilizarem diluentes de longa duração em relação aos diluentes de curta duração (Korniewicz et al., 1996), não tendo essa diferença sido significativa, na comparação entre sêmen suíno diluído em Androhep com amostras de sêmen diluídas em BTS (Waberski et al., 1994).

Quarenta e oito horas após a coleta, o sêmen diluído em Androstar foi o que apresentou os maiores valores de motilidade, seguido pelo BTS e Merck III (P<0,05). Huo et al. (2002) mostraram que a viabilidade e a atividade mitocondrial dos espermatozóides nos meios de longa duração são superiores a 50%, até o 13º dia de conservação.

Com relação aos volumes inseminantes, não foram encontradas diferenças estatísticas (P>0,05) sobre a motilidade espermática dentro de cada tempo estudado, ou seja, todos os volumes apresentaram decréscimo similar da motilidade espermática, ao longo dos dias de avaliação (Figura 2).

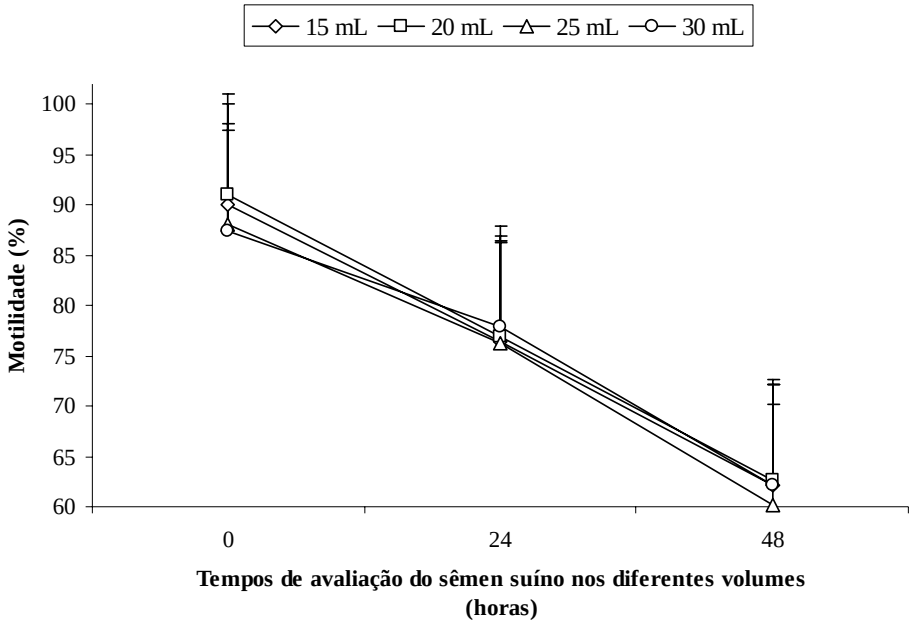

FIGURA 2. Comportamento da motilidade do sêmen suíno nos diferentes volumes, durante os tempos de avaliação (0, 24 e 48 horas)

Os dados da Tabela 3 referem-se às médias de vigor espermático do sêmen suíno nos diferentes diluentes e volumes inseminantes, durante os tempos de avaliação.

TABELA 3. Médias de vigor espermático do sêmen suíno nos diferentes diluentes e volumes inseminantes, durante os tempos de avaliação

Tempo (h)	Diluente	Volume (mL)				Média
		15	20	25	30	
0	Androstar	3,5	3,3	3,4	3,7	3,5
	BTS	3,2	3,4	3,3	3,1	3,3
	Merck III	3,7	3,5	3,1	3,4	3,4
	Média	3,5	3,4	3,1	3,4	
24	Androstar	2,7	2,7	2,9	3,2	2,9
	BTS	2,7	2,8	2,9	2,9	2,8
	Merck III	2,6	2,7	2,2	2,6	2,5
	Média	2,7	2,7	2,7	2,9	
48	Androstar	2,1*	2,1*	2,3	2,3	2,2
	BTS	2,1*	2,0*	2,1*	2,5	2,2
	Merck III	1,7*	2,2	2,0*	2,3	2,1
	Média	1,9	2,1	2,1	2,4	
Sêmen *in natura* (controle)		3,7				
P =		0,01				

* Diferem do sêmen *in natura* pelo teste Kruskal-Wallis (P<0,05)

De acordo com os resultados, todos os diluentes utilizados conservaram o vigor espermático do sêmen *in natura* até o tempo de avaliação de 24 horas (P<0,05).

No dia da coleta (0 hora), o vigor espermático apresentou o mesmo comportamento que a motilidade espermática avaliada neste trabalho, a qual se manteve para todos os volumes e diluentes.

Quarenta e oito horas após a coleta, todas as doses contendo 15 mL, independentemente do diluente, apresentaram vigores espermáticos inferiores em relação ao sêmen *in natura*, enquanto que doses de 30 mL, diluídas em

quaisquer dos diluentes, conservaram o vigor espermático ($P<0,05$). Esta observação pode ser explicada pelo fato de que, em volumes menores, a competição espermática por nutrientes é maior, já que a maior diluição diminui a competição dos espermatozóides por O_2 e por espaço.

Avaliando o sêmen diluído em BTS, no tempo de 48 horas, pode-se dizer que o volume de 30 mL apresentou características mais desejáveis quanto à conservação do vigor espermático, já que foi o único volume que preservou o vigor espermático *in natura* ($P<0,05$). Para os outros dois diluentes, além dos volumes de 30 mL, o volume de 25 mL, no diluente Androstar, e o de 20 mL, no diluente Merck III, apresentaram-se capazes de conservar os vigores espermáticos. Comparando-se estes dados com os dados de motilidade anteriormente apresentados, pode-se dizer que os diluentes utilizados foram mais eficientes na conservação do vigor, já que nenhum volume diluído em quaisquer diluentes teve sua motilidade conservada até o último tempo de avaliação.

Assim como a motilidade, o vigor espermático também apresentou queda gradual no decorrer do tempo de armazenamento.

Na Tabela 4 são apresentados os valores médios de alterações morfológicas espermáticas do sêmen suíno, nos três diferentes diluentes e nos quatro volumes, durante os tempos de avaliação 0 e 48 horas.

Não houve efeito dos diferentes volumes e diluentes sobre as anormalidades espermáticas, durante o período de avaliação do sêmen.

Segundo Scheid (1993), os limites máximos de alterações espermáticas observadas no ejaculado suíno, para se obter uma boa fertilização, são assim estipulados: alterações de cabeça (5%), alterações de cauda espermática (10%) e alterações totais (20%). No presente trabalho, todos os valores se situam dentro de faixas tecnicamente aceitáveis, indicando que o sêmen, sob esse ponto de vista, manteria suas características para uma adequada capacidade fecundante até 48 horas de armazenamento.

TABELA 4. Valores médios de alterações morfológicas espermáticas do sêmen suíno nos três diferentes diluentes e nos quatro volumes, durante os tempos de avaliação 0 e 48 horas

Tempo (h)	Diluente	Volume (mL)				Média
		15	20	25	30	
		Alterações de Cauda (%)				
0	Androstar	6,00	4,67	4,75	5,50	5,23
	BTS	5,28	5,14	3,33	4,31	4,51
	Merck III	7,94	5,33	4,11	4,56	5,49
	Média	6,41	5,05	4,06	4,79	
48	Androstar	7,31	5,06	5,33	8,17	6,47
	BTS	5,83	5,78	5,56	8,39	6,39
	Merck III	5,39	5,72	6,44	5,92	5,87
	Média	6,18	5,52	5,78	7,49	P=0,93
		Alterações de Cabeça (%)				
0	Androstar	0,25	0,53	0,25	0,00	0,26
	BTS	0,25	0,19	0,08	0,17	0,17
	Merck III	0,25	0,50	0,08	0,11	0,24
	Média	0,25	0,41	0,14	0,09	
48	Androstar	0,48	0,20	0,20	0,37	0,31
	BTS	0,20	0,28	0,20	0,45	0,28
	Merck III	0,20	0,20	0,20	0,31	0,23
	Média	0,29	0,23	0,20	0,38	P=0,99
		Total de Alterações (%)				
0	Androstar	9,17	7,75	7,89	8,17	8,24
	BTS	8,00	7,83	5,31	7,42	7,14
	Merck III	9,69	8,25	7,67	7,03	8,16
	Média	8,95	7,94	6,95	7,54	
48	Androstar	10,58	6,75	8,94	10,33	9,15
	BTS	8,03	8,78	7,81	10,39	8,75
	Merck III	7,86	7,81	10,47	7,83	8,49
	Média	8,82	7,78	9,07	9,52	P=0,84

*Não significativo ao teste de qui-quadrado (P>0,05)

Vasconcelos et al. (2001), ao conservarem doses inseminantes contendo 5 bilhões de espermatozóides suínos diluídos em 100 mL de BTS por três dias, obtiveram 85% de espermatozóides normais no último dia de conservação, valor inferior aos observados neste trabalho. Valores mais próximos aos deste experimento foram encontrados por Xu et al. (1996) que, utilizando sêmen suíno com diferentes concentrações (variando de 3.125×10^4 a 5×10^5/mL) diluído em BL-1, meio semelhante ao BTS, observaram cerca de 5% de anormalidades espermáticas.

Gadea (2005) afirma que a morfologia espermática é um parâmetro que está relacionado à fertilidade. Outros trabalhos mostraram que existe uma relação entre a fecundidade dos espermatozóides e a normalidade morfológica (Berger et al., 1996). Portanto, patologias elevadas podem reduzir a capacidade fecundante dos espermatozóides.

Os valores percentuais médios de espermatozóides vivos avaliados no teste de viabilidade espermática do sêmen suíno nos diferentes diluentes e volumes inseminantes estão apresentados na Tabela 5.

TABELA 5. Valores médios de espermatozóides vivos (%) avaliados no teste de viabilidade espermática do sêmen suíno nos três diferentes diluentes e nos quatro volumes, durante os tempos de avaliação 0 e 48 horas

Tempo (h)	Diluente	Volume (mL)				Média
		15	20	25	30	
0	Androstar	91,20	87,80	91,20	91,60	90,50
	BTS	93,70	92,90	93,60	93,30	93,40
	Merck III	89,60	92,00	93,30	92,80	91,90
	Média	91,50	90,90	92,70	92,60	
48	Androstar	64,40	72,20	70,40	70,70	69,40
	BTS	68,70	67,70	67,50	69,40	68,30
	Merck III	66,90	66,40	70,60	69,00	68,20
	Média	66,70	68,80	69,50	69,70	P=0,16

*Não significativo ao teste de qui-quadrado (P>0,05)

Os valores encontrados não apresentaram diferenças entre os volumes e diluentes testados em nenhum dos períodos avaliados (P>0,05).

Este teste serviu como método auxiliar na avaliação da motilidade espermática, permitindo observar que os valores dos dois testes (motilidade e viabilidade espermáticas) foram complementares. Os dados corroboram com os de Fonseca et al. (1992), que relataram que uma diferença de 2% a 10% entre os valores das duas variáveis significa que os espermatozóides com movimentos circulares, não considerados no exame de motilidade ao microscópio e que, no entanto, estando vivos, não receberam o corante.

Embora os diluentes tenham exercido efeito sobre a motilidade espermática, os mesmos não foram capazes de melhorar a viabilidade espermática.

Provavelmente, nas primeiras horas após o início do processo de armazenamento, os espermatozóides ainda não sofreram os efeitos do resfriamento (estresse térmico, choque osmótico), apresentando estabilidade da membrana espermática e, assim, não permitindo a passagem do corante através da mesma. Após 48 horas, os efeitos do processo de resfriamento do sêmen são mais pronunciados, o que refletiu em uma menor proporção de espermatozóides vivos em todos os volumes inseminantes, independente do diluente utilizado.

Um importante indicador das alterações que ocorrem na membrana espermática devido ao armazenamento é a mudança da permeabilidade dessa membrana. Assim, há um aumento da permeabilidade para corantes e, também, a liberação de substâncias intracelulares (liberação de cátions e enzimas), redução da atividade enzimática e alterações nos movimentos laterais dos canais iônicos (Johnson et al., 2000).

Os valores médios percentuais de formas reativas, ou seja, as porcentagens médias de espermatozóides com membrana íntegra resultantes do teste de resistência osmótica são apresentadas na Tabela 6.

TABELA 6. Valores percentuais médios de formas reativas (espermatozóides com membrana íntegra) obtidas pelo teste de resistência osmótica do sêmen suíno, nos três diferentes diluentes e nos quatro volumes durante os tempos de avaliação 0 e 48 horas

Tempo (h)	Diluente	Volume (mL)				Média
		15	20	25	30	
0	Androstar	87,10	89,40	89,10	86,70	88,10
	BTS	86,20	88,40	87,20	88,30	87,50
	Merck III	92,60	90,90	89,10	87,70	90,10
	Média	88,60	89,60	88,40	87,60	
48	Androstar	48,90	45,20	46,40	48,50	47,30
	BTS	45,30	45,90	47,20	48,80	46,80
	Merck III	51,60	50,70	48,60	50,70	50,40
	Média	48,90	47,30	47,40	49,30	P = 0,10

*Não significativo ao teste de qui-quadrado (P>0,05)

A taxa de resistência osmótica não foi influenciada (P>0,05) pelos volumes em nenhum dos diluentes analisados.

O espermatozóide suíno apresenta uma pressão osmótica de 290-300 mOsm e é capaz de tolerar variações de pressão osmótica bastante amplas (240-380 mOsm). Os meios isosmóticos ou levemente hiperosmóticos são os preferidos para a ótima preservação da capacidade de fertilização (Weitze, 1990).

Diversos estudos têm avaliado a tolerância às diversas pressões osmóticas, chegando à conclusão de que nem a motilidade, nem a viabilidade espermática são afetadas pela pressão osmótica em valores compreendidos entre 250 e 290 mOsm (Fraser et al., 2001). Porém, quando a pressão osmótica se reduz abaixo de 200 mOsm, detecta-se uma redução significativa da motilidade (Gilmore et al., 1996; Fraser et al., 2001), acompanhada de queda da integridade de membrana espermática, como se observou neste trabalho.

O TRO permitiu a avaliação da integridade da membrana do espermatozóide por meio de uma prova de resistência a períodos de incubação e ao choque osmótico. O espermatozóide, com uma membrana celular íntegra, se colocado em solução hiposmótica, permite a passagem da água pela membrana celular até o restabelecimento do equilíbrio osmótico entre os fluidos extra e intracelulares (Santos et al., 2001). Com o influxo da água para o interior da célula, há um aumento do volume celular, com posterior dobramento da cauda (Jeyendran et al., 1984).

Na Figura 3 estão apresentadas as porcentagens médias de espermatozóides reativos (espermatozóides com membrana íntegra) ao teste de resistência osmótica do sêmen de suíno diluído nos três diluentes e seus respectivos volumes, nos tempos de avaliação de 0 e 48 horas.

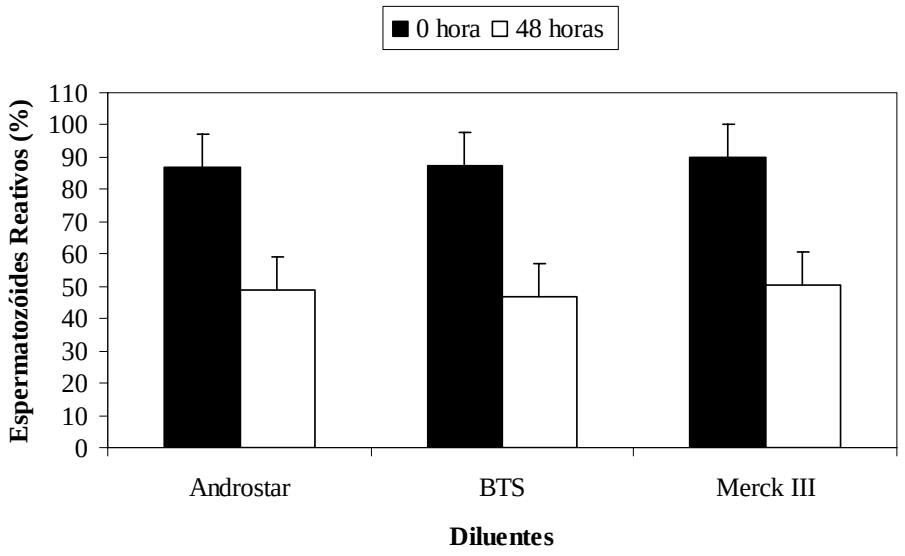

FIGURA 3. Porcentagem média de espermatozóides reativos ao teste de resistência osmótica do sêmen suíno diluído nos diluentes Androstar, BTS e Merck III, durante os tempos de avaliação

Ao longo do período de armazenamento, houve queda na porcentagem de formas reativas a este teste. A diferença dos resultados nos dois períodos analisados pode ter sido decorrente do envelhecimento da célula espermática, tornando a membrana mais sensível, depois de 48 horas de armazenamento.

A porcentagem de formas reativas ao TRO foi, em geral, inferior ao percentual de espermatozóides móveis. Melo et al. (2005), após submeterem amostras de sêmen eqüino resfriado (10 µL de sêmen em 10 mL de cada meio diluidor: Kenney, Baken com 3% de gema e Baken modificado com 10% de gema de ovo) à incubação em meio hiposmótico, também constataram índices de funcionalidade inferiores aos de motilidade. Segundo estes autores, isso leva a refletir que se podem ter células móveis, mas pouco resistentes ao estresse osmótico e, ainda, ter células imóveis, mas que mantiveram a integridade funcional da membrana plasmática, não sendo necessariamente a mesma subpopulação espermática avaliada nos dois testes de funcionalidade, indicando a complementaridade dos testes para diagnóstico do potencial de fertilização.

Murgas (1999), utilizando este teste para verificar a viabilidade espermática em reprodutores suínos, não observou correlação deste teste com a motilidade espermática. No presente experimento, os diluentes resultaram em diferentes comportamentos de motilidade espermática, porém, o mesmo não ocorreu para o teste de resistência osmótica. Sugere-se que os diluentes não exerçam efeito sobre a resistência da membrana espermática, mas sim sobre a capacidade de motilidade espermática. Isso foi observado também no teste de viabilidade espermática, em que nem os diluentes nem os volumes exerceram efeito sobre a membrana plasmática.

Valores semelhantes ao deste trabalho foram encontrados por Ferreira et al. (2001) que, utilizando solução a 100mOsmol, com tempo de incubação de 25 minutos, obtiveram, para o sêmen resfriado caprino, médias de 88% no primeiro dia de armazenamento. Já Salgueiro et al. (2003b), encontraram valores

superiores a estes (médias acima de 90%), utilizando sêmen resfriado caprino, sem, no entanto, relatar qual o tempo de incubação e a osmolaridade utilizada no teste, o que reduz o valor prático do estudo realizado.

Jeyendran et al. (1984) relataram que a técnica de resistência osmótica utilizada para avaliar a integridade funcional da membrana espermática apresenta correlação com a capacidade de fertilização *in vitro* dos espermatozóides. Esses autores afirmaram, ainda, que esta técnica pode ser utilizada somando-se a outras para melhorar as análises de sêmen. A manutenção da membrana do espermatozóide íntegra é fundamental para a reação acrossômica, etapa que antecipa a penetração na zona pelúcida e a fecundação (Park, 1997; citado por Goulart et al., 2004).

As taxas médias de degradação de motilidade calculadas para o teste de termorresistência estão apresentadas na Tabela 7.

TABELA 7. Taxas médias de degradação de motilidade espermática (%) do sêmen suíno nos três diferentes diluentes e nos quatro volumes, durante os tempos de avaliação 0, 24 e 48 horas

Tempo (h)	Diluente	Volume (mL)				Média
		15	20	25	30	
0	Androstar	20,40	25,90	26,30	28,40	25,20
	BTS	28,10	20,10	20,80	24,80	23,40
	Merck III	28,30	24,30	27,30	25,60	26,40
	Média	25,60	23,40	24,80	26,30	
24	Androstar	37,10	28,80	32,20	36,40	33,60
	BTS	29,70	23,20	23,90	35,00	27,90
	Merck III	22,50	24,20	26,90	27,80	25,30
	Média	29,80	25,40	27,90	33,10	
48	Androstar	39,40	33,90	30,80	39,40	35,90
	BTS	36,90	32,00	38,10	33,60	35,10
	Merck III	37,90	32,00	39,90	39,00	37,20
	Média	38,10	32,60	36,30	37,30	P=0,13

*Não significativo ao teste de qui-quadrado (P>0,05)

Os resultados estatísticos não mostraram efeito significativo dos diluentes e dos volumes inseminantes sobre esta variável (P>0,05).

Segundo Salgueiro et al. (2003b), a taxa de degradação de motilidade está relacionada com a fertilidade e deve estar entre 30% a 50% para o sêmen caprino. De acordo com Henry & Neves (1998), o sêmen bovino é de boa qualidade quando, depois de submetido ao teste de termorresistência, apresenta, pelo menos, 15% de motilidade espermática progressiva.

Toniolli (1988), citado por Uchoa et al. (2002), utilizando diluidores à base de água de coco, observaram valores de TDM entre 20% e 40% para o sêmen suíno, empregando, para o teste de termorresistência, a mesma temperatura e tempo de avaliação deste trabalho. Segundo este mesmo autor, valores para TDM entre 20% e 40% geram melhores resultados de fertilidade das fêmeas suínas inseminadas, partindo-se do princípio de que as mesmas se encontrem em perfeitas condições de saúde.

Assim como para os valores de alterações de morfologia espermática, todos os valores de TDM do presente estudo se situaram dentro das faixas estabelecidas como ótimas, indicando que o sêmen, sob esse ponto de vista, apresentaria índices satisfatórios de fecundação.

4 Conclusões

O diluente Androstar garante a qualidade do sêmen até 48 horas após a coleta, e o BTS e o Merck III, até 24 horas.

Volumes entre 15 e 30 mL podem ser utilizados na inseminação intra-uterina até 48 horas após a coleta de sêmen, sem afetar a qualidade espermática das doses inseminantes.

5 Referências Bibliográficas

ALEXOPOULOS, C.; BOSCOS, C.; SARATSIS, P.; SAOULIDIS, C.; KYRIAKIS, S. The effect of storage time and number of spermatozoa per insemination dose on semen characteristics and fertilizing capacity of boar semen diluited with Belstville Thaw Solution (BTS) extender. **Animal Science**, v.62, n.3, p.599-604, 1996.

ALVAREZ, J.; STOREY, B. Spontaneous lipid peroxidation in rabbit epididymal spermatozoa: its effect on sperm motility. **Biology of Reproduction**, v.27, p.1102-1108, 1982.

BERGER, T.; ANDERSON, D.L.; PENEDO, M.C.T. Porcine sperm fertilizing potencial in relationship to sperm functional capacities. **Animal Reproduction Science**, v.44, n.4, p.231-239, 1996.

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 espermatozóides necessários por fêmea ao ano. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, p.133-139, 2003.

BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I.; DALLANORA, D. Situação atual da inseminação artificial em suínos. **Acta Scientiae Veterinariae,** Porto Alegre, v.33, n.1, p.17-32, 2005.

DALLANORA, D.; MEZALIRA, A.; KATZER, L.H.; BERNARDI, M.L.; BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I. Desempenho reprodutivo de fêmeas suínas Inseminadas pela técnica intra-uterina ou tradicional. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n..8, p.815-819, 2004.

FERREIRA, G.M.B.C.; SOUSA, J.P.F.; BARBAS, P.; HORTA, A.E.M. Teste de endosmose (HOST) em sêmen de caprinos da raça Serrana. In: CONGRESSO IBÉRICO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 3., Porto, 2001. **Proceedings**... Porto: Fundação Cupertino de Miranda, 2001. p.559-564.

FONSECA, V.O.; VALE FILHO, V.R.; MIES FILHO, A.; ABREU, J.J. **Procedimentos para exame andrológico e avaliação de sêmen animal.** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1992. 79p.

FRASER, L.; GORSZCZARUK, K.; STRZEZEK, J. Relationship between motility and membrane integrity of boar spermatozoa in media varying in osmolality. **Reproduction of Domestic Animals**, v.36, p.325-329, 2001.

GADEA, J. Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. **Theriogenology,** v.63, n.2, p.431-444, 2005.

GARNER, D.L.; THOMAS, C.A.; GRAVANCE, C.G.; MARSHALL, C.E.; DeJARNETTE, J.M.; ALLEN, C.H. Seminal plasma addition attenuates the dilution effect in bovine sperm. **Theriogenology**, v.56, n.1, p.31-40, 2001.

GILMORE, J.A.; DU, J.; TAO, J.; PETER, A.T.; CRITSER, J.K. Osmotic properties of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation. **Journal Reproduction Fertility**, v.107, p.87-95, 1996.

GOULART, H.M.; SILVA, A.E.D.F.; McMANUS, C.; PAPA, F.O. Efeitos da pentoxifilina sobre a viabilidade *in vitro* dos espermatozóides de eqüino, após o resfriamento a 5° C. **Revista Brasileira de Zootecnia,** Viçosa, v.33, n.1, p.112-122, 2004.

HENRY, M.; NEVES, J.P. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2.ed. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1998. 49p.

HUO, L.J.; MA, X.H.; YANG, Z.M. Assessment of sperm viability, mitochondrial activity, capacitation and acrosome intactness in extended boar semen during long-term storage. **Theriogenology**, v.58, p.1349-1360, 2002.

JEYENDRAN, R.S.; VAN DER VEM, H.H.; PEREZ-PELAEZ, M.; CRABO, B.G.; ZANEVELD, L.J. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal Reproduction Fertility**, v.70, p.219-228, 1984.

JOHNSON, L.A.; AALBERS, J.G.; WILLEMS, C.M.T.; RADEMAKER, J.H.M.; REXROAD JR, C.E. Use of boar spermatozoa for artificial insemination III. Fecundity of boar spermatozoa stored in Beltsville Liquid and Kiev Extenders for three days at 18C. **Journal of Animal Science**, v.54, p.132-141, 1982.

JOHNSON, L.A.; WEITZE, K.F.; FISER, P.; MAXWELL, W.M.C. Storage of boar semen **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.62, n. 1/3, p.143-172, 2000.

KING, G.I.; MACPHERSON, I.W. A comparison of two methods for boar semen collection. **Journal of Animal Science,** v.36, n.4, p.563-565, 1973.

KOMMISRUD, E.; PAULENZ, H.; SEHESTED, E.; GREVLE, I.S. Influence of boar and semen parameters on motility and acrosome integrity in liquid boar semen storage for five days. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.43, n.1, p.49-55, 2002.

KORNIEWICZ D.; SZCZESNIAK-FABIANCZYK, B.; SMORAG, Z. The survival rate and fertilizing capacity of boar semen diluted with different diluents. **Reproduction of Domestic Animals,** v.31, p.273-274, 1996.

KOTZIAS-BANDEIRA, E. Influence of different diluents and cooling temperatures on the quality of boar semen. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, São Paulo, v.36, n.4, 1999. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S14135961999000400005&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 25 abr. 2007.

KUSTER, C.E.; ALTHOUSE, G.C. The fecundity of porcine semen stored for 2 to 6 days in Androhep and X-CELL extenders. **Theriogenology**, v.52, n.3, p.365-376, 1999.

MARTIN RILLO, S.; MARTINEZ, E.; GARCIA-ARTIGA, C.; DE-ALBA, C. Boar semen evaluation in practice. **Reproduction Domestics Animal,** v.31, n.3, p.519-526, 1996.

MELO, M.I.V.; HENRY, M.; BEKER, A.R.C.L. Teste hiposmótico para avaliação da viabilidade do sêmen eqüino resfriado com diferentes diluidores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia,** v.57, n.6, p.757-763, 2005.

MELO, M.I.V.; HENRY, M. Teste hiposmótico na avaliação do sêmen eqüino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia,** v.51, p.77-78, 1999.

MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais domésticos e inseminação artificial,** Porto Alegre: Sulina, 1982. v.5, 380p.

MURGAS, L.D.S. **Desempenho reprodutivo de varrões híbridos alimentados com rações suplementadas com óleo de soja como fonte de ácidos graxos.** 1999. 111 p. Tese (Doutorado em Nutrição Animal - Monogástricos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PAQUIGNON, M.; BUSSIERE, J.; BARITEAU, F. Resultats recents en matiere de technologie de la conservation de la semence de verrat. **Journées Recherche Porcine en France**, v.19, p.63-78, 1987.

PAULENZ, H.; KOMMISRUD, E.; HOFMO, P.O. Effect of long-term storage at different temperatures on the quality of liquid boar semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v.35, p.83-87, 2000.

RATH, D. Low dose insemination in the sow – a review. **Reproduction in Domestic Animals**, v.37, p.201-205, 2002.

SAEG. **Sistemas para análises estatísticas**. Versão 5.0. Viçosa, MG: Fundação Arthur Bernardes, 1993. Software.

SALGUEIRO, C.C.M.; MATEOS-REX, E.; SAMPAIO NETO, J.C.; NUNES, J.F. Utilization of different extenders and methods for the freezing of Murciano-Granadina buck semen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.4, p.625-630, 2003a.

SALGUEIRO, C.C.M.; NUNES, J.F.; MATEOS-REX, E.; CORDEIRO, M.A.; MAGALHÃES, D.M.; CAVALCANTE, J.M.M; PALÁCIO, A.R.S. Avaliação da qualidade do sêmen caprino pós-descongelamento através do teste hiposmótico. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.3, p.377-378, 2003b.

SANTOS, A.D.F.; TORRES, C.A.A.; FONSECA, J.F.; BORGES, A.M.; ROVAY, H.; GORETTI, R.G.; GUIMARÃES, J.D.; COSTA, E.P.; BARBOSA, L.P.; MAFFILI, V.V.; FRAGA, D.B.M. Uso do teste hiposmótico (HOST) para avaliar a congelabilidade do sêmen de caprinos das raças Alpina e Saanen, jovens e adultos, submetidos ao manejo com luz artificial. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, n. 3, p.438-439, 2001.

SCHEID, I.R. **Manual de inseminação artificial de suínos: procedimentos e métodos no laboratório**. Concórdia: CNPSA/EMBRAPA, 1993. 48 p.

UCHOA, D.C.; SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; PEREIRA, B.S.; SILVA, L.D.M. Conservação do sêmen canino a 37oc em diluentes à base de água de coco. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.1, p.91-95, 2002.

VASCONCELOS, A.M.M.A.; MORAES, G.V.; MOREIRA, I.; RIGOLON, L.P.; MARTINS, E.N. Características espermáticas de sêmen resfriado de suíno

e conservado em diferentes diluentes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.2, p.394-401, 2001.

VYT, P. **Examination and storage of liquid porcine semen**. 2007. 162p. Thesis (Doctorate in Veterinary Science) – Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Ghent, Belgium.

WABERSKI, D.; MEDING, S.; DIRKSEN, G. Fertility of long-term stored boar semen: Influence of extenders (Androhep and Kiev), storage time and plasma droplets in the semen. **Animal Reproduction Science**, v.36, p.145-151, 1994.

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.

WEITZE, K. The use of long-term extenders in pig AI - a view of the international situation. **Pig News and Information**, v.11, n.1, p.23-26, 1990.

WOELDERS, H. Maintaining quality of boar sperm during storage and transportation. **Pigs-Misset**, Netherlands, v.8, p.22-23, 1992.

XU, X.; SETH, P.C.; HARBISON, D.S.; CHEUNG, A.P.; FOXCROFT, G.R. Semen dilution for assessment of boar ejaculate quality in pig IVM and IVF systems. **Theriogenology**, v.46, n.8, p.1325-1337, 1996.

CAPÍTULO III

DESEMPENHO REPRODUTIVO DE FÊMEAS SUÍNAS INSEMINADAS PELA TÉCNICA INTRA-UTERINA UTILIZANDO-SE DOSES DE SÊMEN COM DIFERENTES VOLUMES E DILUENTES

RESUMO

O objetivo da realização deste experimento foi o de avaliar o desempenho reprodutivo de 72 fêmeas suínas, utilizando-se diferentes diluentes e volumes de sêmen, destinados à inseminação artificial intra-uterina. Como doadores de sêmen, foram utilizados três machos de fertilidade comprovada. Os ejaculados foram diluídos em partes iguais, com Androstar, BTS e Merck III, constituindo doses com 1,5 bilhão de espermatozóides em volumes de 15 ou 30 mL. Adotou-se um delineamento em blocos ao acaso, em esquema fatorial 3 x 2 (três diluentes e dois volumes inseminantes). Os blocos foram constituídos pela ordem de parição e pelo macho utilizado, totalizando 12 repetições com um animal por parcela experimental. Após o início do estro, as fêmeas foram inseminadas pela técnica de inseminação artificial intra-uterina. Cada fêmea recebeu duas inseminações por cio, de modo que as doses utilizadas pertenciam a um mesmo macho. As doses utilizadas foram armazenadas por um tempo máximo de 48 horas após a coleta. As variáveis analisadas foram a taxa de parto, o índice de retorno ao cio, o número total de leitões nascidos, o número de leitões nascidos vivos, mumificados e natimortos e o peso da leitegada ao nascimento. Não foram observadas diferenças entre as taxas de parto e as taxas de retorno ao cio das fêmeas inseminadas ($P>0,05$). O percentual de fêmeas paridas variou de 75,00% a 91,70%. As maiores médias de número total de nascidos, número de leitões nascidos vivos e peso de leitegada ao nascimento foram de fêmeas inseminadas com doses contendo BTS e Merck III ($P<0,05$). Não houve diferenças entre os volumes inseminantes dentro dos diluentes BTS e Merck III para nenhuma das variáveis ($P>0,05$). Para o Androstar, o volume que proporcionou maior tamanho de leitegada e número de leitões nascidos vivos foi de 15 mL ($P<0,05$). Com relação ao número de natimortos e mumificados, os valores não diferiram entre os diluentes e os volumes utilizados ($P>0,05$) e estão dentro dos valores preconizados, tanto para natimortos quanto para mumificados. A inseminação intra-uterina de fêmeas suínas de ordem de parto dois a cinco, com doses inseminantes de 15 e 30 mL diluídas em BTS ou Merck III, permite índices satisfatórios de desempenho reprodutivo. Em casos da utilização do diluente Androstar na inseminação intra-uterina, em detrimento aos diluentes de curta duração, recomenda-se a utilização de volume inseminante de 15 mL.

Palavras-chave: Androstar, BTS, Merck, porcas, reprodução

REPRODUCTIVE PERFORMANCE OF SWINE FEMALES INSEMINATED BY THE INTRAUTERINE TECHNIQUE USING SEMEN DOSES WITH DIFFERENT VOLUMES AND DILUENTS

Abstract - The objective of this study was to evaluate the reproductive performance of 72 sows using different diluents and semen volumes destined for the intrauterine artificial insemination. Three boars of proven fertility were used as semen donors. The ejaculates were diluted in similar parts, with the Androstar, BTS and Merck III, constituting semen doses of 1.5 billion spermatozoids in volumes of 15 or 30 mL. It was adopted a randomized blocks design, in a factorial scheme 3 x 2 (three diluents and two semen volumes). The blocks were constituted by the females parities and by the used males, totaling 12 repetitions with one animal per experimental unit. After the beginning of estrus, the females were inseminated through the technique of intrauterine artificial insemination. Each female received two inseminations per estrus, so that the used doses belonged to a same male. The used doses were stored by a maximum time of 48 hours. The analyzed variables were farrowing rate, indexes of return to estrus, total number of piglets born, number of born alive, mummified and stillborn piglets, and litter weight at birth. There were no effects of treatments on farrowing rates and indexes of return to estrus ($P>0.05$). The percentage of farrowed females varied from 75.00% to 91.70%. The largest averages of total number of piglets born, number of piglets born alive and litter weight at birth were from females inseminated with semen doses diluted in BTS and Merck III ($P<0.05$). There were no differences among the semen volumes inside of the diluents BTS and Merck III for none of the variables ($P>0.05$). For Androstar, the volume that provided the largest litter size and number of piglets born alive was 15 mL ($P<0.05$). In relation to the number of stillborn and mummified piglets, the values did not differ between the used diluents and volumes ($P>0.05$) and they are inside of the values extolled so for stillborn as to mummified. The intrauterine insemination of sows from two to five parities, with semen doses of 15 and 30 mL diluted in BTS or Merck III allow satisfactory indexes of reproductive performance. In cases of using the diluent Androstar for intrauterine insemination, instead of the diluents of short duration, the use of semen volume of 15 mL is recommended.

Keywords: Androstar, BTS, Merck, reproduction, sows

1 Introdução

A eficiência reprodutiva tem grande importância na produção de suínos e pode ser estimada pela produtividade da fêmea, ou seja, pelo número de leitões desmamados por fêmea por ano (Williams, 2007). Altos índices deste parâmetro têm sido alcançados graças à utilização da técnica de inseminação artificial e de biotécnicas reprodutivas que recentemente surgiram a partir dela.

Com a utilização de novas biotecnologias, como a inseminação artificial intra-uterina, na qual se reduzem o número de espermatozóides e o volume por dose, serão necessárias novas condições de conservação e, em conseqüência, será necessário estudar o melhor diluente para esta técnica (Rath, 2002).

Considerando a produção de doses com volume reduzido, destinadas à inseminação intra-uterina, a quantidade de água a ser utilizada seria de aproximadamente ¼ da utilizada para a produção de doses destinadas à técnica de inseminação tradicional. Sendo assim, esta economia permite o emprego de águas com maior grau de purificação. Além disso, parte desta economia poderá se voltar para a aquisição de diluentes de longa duração (Bortolozzo et al., 2005a).

Boas respostas reprodutivas das fêmeas foram obtidas quando o sêmen e o diluente foram de alta qualidade, uma vez que as experiências mostraram que apenas 20% dos ejaculados coletados de estudos típicos de inseminação artificial poderiam ser conservados por longo tempo (Revell & Glossop, 1989). Estes autores também verificaram diferenças entre diluentes quanto à fecundidade, destacando a necessidade de se descobrirem diluentes capazes de conservar sêmen por cinco a seis dias, sem que haja redução na fecundidade das fêmeas, ao serem inseminadas.

Ainda existem muitas dúvidas com relação às características da dose inseminante recomendada para a inseminação artificial intra-uterina. Alguns autores afirmam que o volume da dose inseminante poderia comprometer o

desempenho reprodutivo de fêmeas de diferentes ordens de parto (Behan & Watson, 2004). Resultados bastante satisfatórios foram obtidos empregando-se doses com volume de diluente entre 20-30 mL, em fêmeas adultas (Bennemann et al., 2004).

Quando doses inseminantes com baixos volumes são utilizadas, a relação entre o volume do ejaculado e do diluente continua sendo muito próxima à empregada na técnica tradicional de inseminação. No entanto, o volume de ejaculado por dose cai para valores próximos a 2-4 mL. Conseqüentemente, o volume de plasma seminal (e outros componentes do ejaculado) estaria em uma quantidade absoluta inferior ao da inseminação tradicional (Bortolozzo et al., 2005b).

Nesse sentido, este trabalho tem como objetivo avaliar se volumes reduzidos de ejaculado que compõem as doses destinadas à inseminação intra-uterina poderiam prejudicar o desempenho reprodutivo de matrizes suínas, além de estudar os efeitos de diferentes diluentes sobre os parâmetros reprodutivos destas fêmeas.

2 Material e Métodos

O trabalho foi conduzido em uma granja comercial, com produção de suínos em ciclo completo, pertencente à Fazenda São Paulo, no município de Oliveira, MG, entre os meses de julho a dezembro de 2007.

Para a realização do trabalho experimental, foram utilizadas 72 fêmeas multíparas de genética Dan Bred, linhagem DB 90, com ordem de parto entre 2 a 5, intervalo desmame-cio de 2 a 6 dias, duração da lactação de 15 a 19 dias e tamanho médio de leitegada nos partos anteriores superior a 9 leitões. O peso das fêmeas variou de 210 a 230 kg para as fêmeas de ordem de parto 2, 250-260 kg para as de ordem de parto 3 e 4, e as de ordem de parto 5 pesavam, em média, 270 kg.

As fêmeas foram mantidas em gaiolas de gestação e receberam 2,4 kg diários de ração de gestação (EM=2.900 kcal/kg e 14,73% de proteína bruta) da cobertura até o 86º dia de gestação. Do 86º dia até o fim da gestação, as fêmeas receberam 3,3 kg diários de ração pré-lactação, contendo 17,56% de proteína bruta e 3,17 Mcal de energia metabolizável por quilo de ração.

Sete dias antes do parto, as fêmeas foram transferidas para a maternidade e submetidas a um banho completo. Durante a lactação, as fêmeas receberam ração de lactação à vontade, contendo 3.480 kcal/kg de energia metabolizável e 18,98% de proteína bruta.

Como doadores de sêmen, foram utilizados três machos (genética Agroceres PIC e linhagem 337TGSUP) de fertilidade comprovada, sendo a coleta realizada pelo método da mão enluvada. Para a avaliação do ejaculado foram considerados a motilidade, o vigor e a concentração espermáticos. A motilidade e o vigor foram avaliados em microscopia óptica com aumento de 40 vezes. A motilidade foi expressa em percentual de células móveis da amostra (0 a 100). Para o vigor, foram atribuídos valores de 1 a 5 pontos, entre os quais os mais elevados indicaram os espermatozóides mais vigorosos. A concentração espermática foi obtida por contagem direta de espermatozóides utilizando a câmara de Neubauer. Cada ejaculado foi fracionado em três partes iguais, tendo cada uma sido diluída na proporção de 1:1, utilizando três diferentes diluentes: Androstar, Beltsville Thawing Solution (BTS) e Merck III, cujas composições encontram-se na Tabela 1.

Após a diluição, foram retiradas alíquotas correspondentes a 1,5 bilhão de espermatozóides de cada uma das três frações. O número total de células espermáticas de 1,5 bilhão foi obtido calculando-se, por regra de três, o volume do ejaculado a ser transferido para cada frasco, por meio da multiplicação do volume total do ejaculado diluído por 1,5 bilhão, seguida da divisão deste resultado pelo número total de espermatozóides no ejaculado.

TABELA 1. Composição dos diluentes Androstar, BTS e Merck III

Produto	Androstar[*1]	BTS[*2]	Merck III[*2]
Glicose (g)	66,25	79,90	89,20
Citrato de sódio (g)	11,00	12,71	3,05
Bicarbonato de sódio (g)	13,50	2,65	4,20
EDTA[3] (g)	6,50	2,65	3,05
TRIS[4] (g)	2,00	-	-
Cloreto de potássio (g)	-	1,59	-
Sulfato de Gentamicina (g)	0,75	0,59	0.50
Água deionizada (l)	1,00	1,00	1,00
Osmolaridade (mOsm)	309	330	340
pH	7,20	7,20	6,80

[*]Diluentes fabricados pela Minitüb Abfüll-und Labortechnik Gmbh & Co. KG. e importados e distribuídos pela Minitüb do Brasil; Valores para cada 100 g de diluente. [1]Diluente considerado de longa-duração (período de conservação superior a três dias); [2]Diluentes considerados de curta-duração (período de conservação por até três dias); [3]EDTA: Etilenodiamino tetracetato; [4]TRIS: Hidroxi-metil-amino-metano.

De cada fração foram retiradas duas alíquotas, tendo cada alíquota sido transferida para um frasco plástico de 100 mL. Posteriormente, foram acrescentados os respectivos diluentes, a fim de se obter volumes finais de 15 e 30 mL. Portanto, para cada uma das três frações de ejaculado diluído com um diluente específico, foram obtidos dois frascos com volumes diferentes, totalizando seis tratamentos (3 diluentes x 2 volumes). Foram utilizadas 12 fêmeas por tratamento. Todas as doses foram produzidas em “split sample”, ou seja, as doses utilizadas em ambos os tratamentos foram produzidas a partir dos mesmos ejaculados e o sêmen foi conservado de 24 a 48 horas, em temperatura de 15ºC a 18ºC. Foi realizada uma contraprova para aferir a concentração de cada dose produzida por meio de um aparelho de espectrofotômetro.

Após o desmame, foi realizada a detecção do estro, duas vezes por dia (manhã e tarde), pelo reflexo de tolerância ao homem na presença do macho. Posteriormente ao início do estro, as fêmeas foram distribuídas aleatoriamente em gaiolas individuais de gestação e foram inseminadas por meio da técnica de inseminação artificial intra-uterina (IAIU), tendo, para cada tratamento, sido utilizadas fêmeas de todas as ordens de parto compreendidas entre 2 e 5. Para esta técnica, utilizou-se uma pipeta de inseminação artificial descartável (tubo de polipropileno com esponja de poliuretano) e um cateter semi-rígido de polipropileno, com três milímetros de diâmetro externo e dois milímetros de diâmetro interno. O cateter deslizava internamente à pipeta, estendendo-se 20 cm além das pregas cervicais, alcançando a região da bifurcação dos cornos ou, mesmo, um dos cornos uterinos, permitindo a deposição intra-uterina da dose inseminante. A pipeta utilizada foi a do tipo Verona (Foamtip™ - Minitub).

As inseminações foram realizadas por um único inseminador, tendo cada fêmea recebido duas inseminações por cio, num total de 1,5 bilhão de espermatozóides cada. As inseminações foram realizadas na presença do macho, sendo a primeira realizada 24 horas após as fêmeas apresentarem sintomas característicos do cio, e a segunda, 24 horas depois da primeira.

O diagnóstico de retorno ao estro foi efetuado a partir dos 18 e até os 23 dias após a IAIU, pelo teste de reflexo de tolerância ao homem na presença do macho. Entre 25 e 30 dias após a inseminação artificial, foi realizado o diagnóstico de gestação, em que todas as fêmeas submetidas à IAIU foram examinadas por ultra-sonografia transcutânea em tempo real, com transdutor setorial de 5MHz (Agroscan - IMV®).

As variáveis analisadas foram taxa de parto (número de matrizes que pariram em relação ao número de matrizes que foram inseminadas), índice de retorno ao cio (porcentagem das fêmeas que retornaram ao cio após terem sido

inseminadas), número total de leitões nascidos, número de leitões nascidos vivos, mumificados e natimortos, e peso da leitegada ao nascimento.

Foi adotado um delineamento em blocos ao acaso, em esquema fatorial 3 x 2 (três diluentes e dois volumes inseminantes). Os blocos foram constituídos pela ordem de parição e pelo macho doador do ejaculado, totalizando 12 repetições, com um animal por parcela experimental.

Os parâmetros número total de leitões nascidos, número de leitões nascidos vivos e peso da leitegada ao nascimento foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas entre si pelo teste Tukey.

As variáveis taxa de parto, taxa de retorno ao estro, número de leitões mumificados e natimortos foram submetidas à análise não paramétrica, visto que os dados não atingiram a normalidade mesmo após a transformação dos mesmos. Neste caso, as médias foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis, quando houve significância ao teste qui-quadrado ($P<0,05$).

Todas as análises foram realizadas utilizando-se o Sistema de Análise Estatística e Genética da Universidade Federal de Viçosa (SAEG, 1993).

3 Resultados e Discussão

Os resultados de taxa de parição e o índice de retorno ao estro das fêmeas inseminadas intra-uterinamente, utilizando-se diferentes diluentes e volumes inseminantes, estão apresentados na Tabela 2.

Não foram observadas diferenças entre as taxas de parto e as taxas de retorno ao cio das fêmeas inseminadas ($P>0,05$). Em concordância com o trabalho de Dallanora et al. (2004), a deposição intra-uterina de 1,5 bilhão de espermatozóides permitiu a formação eficiente do reservatório espermático na junção útero-tubárica e adequada fecundação. No trabalho destes autores, as doses destinadas à inseminação intra-uterina das matrizes suínas foram diluídas

em 60 mL de BTS e obtiveram-se valores de taxas de parto (92,80%) próximos aos do presente estudo, quando o volume de 30 mL foi utilizado (91,70%).

TABELA 2. Valores médios de taxa de parto e índice de retorno ao estro das fêmeas inseminadas intra-uterinamente, com doses de 15 e 30 mL diluídas em Androstar, BTS e Merck III

	Taxa de Parto (%)		Taxa de Retorno ao Cio (%)	
Diluente	15 mL	30mL	15 mL	30mL
Androstar	91,70	83,30	8,30	16,70
BTS	83,30	91,70	16,70	8,30
Merck III	91,70	75,00	8,30	25,00
P = 0,97				

*Não significativo ao teste de qui-quadrado (P>0,05)

O percentual de fêmeas paridas variou de 75,00% a 91,70%. A maior freqüência de retorno ao cio foi de 25,00% para fêmeas inseminadas com sêmen diluído em Merck III com doses de 30 mL. Vasconcelos et al. (2001), ao compararem diluentes de longa duração (ZOR e BTZOR) frente ao BTS, utilizaram doses inseminantes de 5 bilhões de espermatozóides em 100 mL de BTS destinados à inseminação tradicional e encontraram taxas de retorno ao cio superiores às do presente trabalho (32,10%). Segundo Jainudeen & Hafez (2004), aproximadamente 25,00% a 40,00% dos embriões são naturalmente perdidos nas espécies domésticas, entre a época de penetração do óvulo pelo espermatozóide e o final da implantação. No entanto, os valores entre 67,90% e 75,00% de taxa de parto não podem ser atribuídos a perdas naturais e são, portanto, considerados insatisfatórios.

Scheid (1991), ao testar os diluentes Kiew, BTS (diluentes de curta duração) e o Reading (diluente de longa duração), em volumes de 100 mL, encontrou taxas de parto que não diferiram significativamente: 87,10% para Kiew, 91,70% para BTS e 89,80% para Reading. O mesmo ocorreu neste

trabalho, no qual diferenças entre os diluentes não foram encontradas para esta variável.

Dentre as doses que continham 15 mL, aquelas que foram diluídas em Androstar e Merck III apresentaram taxas de parto superiores. Por outro lado, as doses diluídas em BTS apresentaram maiores taxas de parto quando continham 30 mL.

Segundo Reis (1997), a taxa de diluição do sêmen é um fator que interfere no período de preservação e na viabilidade dos espermatozóides e, conseqüentemente, nos resultados de inseminação artificial.

Behan & Watson (2004) compararam a eficiência reprodutiva de matrizes suínas inseminadas com 1,5 bilhão de espermatozóides, diluídos em 25, 50 e 75 mL de diluente Safecell Plus. Diferenças significativas foram encontradas para as taxas de parto entre as fêmeas inseminadas com 50 mL (91,50%) e 75 mL (91,90%) versus aquelas inseminadas com 25 mL (63,40%). O volume de 30 mL, tecnicamente o mais próximo ao de 25 mL utilizado no trabalho de Behan & Watson (2004), proporcionou, em média, taxa de parto mais alta que a destes autores. Essa diferença pode ter sido em virtude dos diferentes diluentes utilizados em ambos os trabalhos.

Na Tabela 3 são apresentados os valores médios do número total de leitões nascidos e número de leitões nascidos vivos. Embora as taxas de parto e as taxas de retorno ao cio não tenham apresentado diferenças significativas entre os tratamentos, estas variáveis diferiram entre os grupos.

Dentre as doses de 15 mL, não houve diferença entre os diluentes utilizados. As fêmeas que foram inseminadas com doses de 30 mL apresentaram maiores tamanho de leitegada e número de leitões nascidos vivos quando o sêmen foi diluído em Merck III e BTS ($P<0,05$). Estes dados contradizem os de Ratto & Jokinen, (1990) que, ao compararem diluidores de curta duração com os de longa duração, não observaram diferenças na fertilidade ou na prolificidade

das fêmeas suínas inseminadas, utilizando doses com três bilhões de espermatozóides em 100 mL.

TABELA 3. Médias e erros-padrão do número total de leitões nascidos e número de leitões nascidos vivos de fêmeas inseminadas intra-uterinamente, com doses de 15 e 30 mL diluídas em Androstar, BTS e Merck III

Diluente	Volume (mL)		Média
	15	30	
	Número Total de Leitões Nascidos		
Androstar	12,50 ± 0,78 **a**	9,50 ± 0,78 **Bb**	11,00 ± 0,55
BTS	10,80 ± 0,78	12,10 ± 0,78 **AB**	11,40 ± 0,55
Merck III	10,90 ± 0,78	13,00 ± 0,78 **A**	12,00 ± 0,55
Média	11,40 ± 0,45	11,50 ± 0,45	
P = 0,003			CV = 23,55%
	Número de Leitões Nascidos Vivos		
Androstar	12,0 ± 0,69 **a**	8,8 ± 0,69 **Bb**	10,4 ± 0,49
BTS	10,1 ± 0,69	10,7 ± 0,69 **AB**	10,4 ± 0,49
Merck III	10,5 ± 0,69	12,3 ± 0,69 **A**	11,4 ± 0,49
Média	10,8 ± 0,40	10,6 ± 0,40	
P = 0,001			CV = 22,42%

[1]Médias seguidas de diferentes letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas diferem (P<0,05) pelo teste Tukey

Os diluentes de curta duração apresentaram maiores médias de leitões nascidos vivos em relação ao diluente de longa duração (P<0,05) para o volume de 30 mL (Figura 1).

Contradizendo estes dados, Vasconcelos et al. (2001) observaram que o diluente de longa duração utilizado em seu trabalho (Zorlesco-modificado) apresentou maiores médias de número total de leitões nascidos (11,89±1,48) e de número de leitões nascidos vivos (10,37±1,48), em relação aos outros diluentes utilizados (8,97±1,48 e 7,55±1,48 para BTS e, 9,18±1,51 e 7,33±1,51 para BTZOR, respectivamente). Provavelmente, o diluente Zorlesco-modificado apresentou maiores médias devido à presença do soro fetal bovino existente em

sua composição, o que deve ter propiciado melhores condições aos seus espermatozóides, em função de suas propriedades antiaglutinantes e antitóxicas, em relação aos outros diluentes (BTZOR e BTS) e até mesmo em relação ao Androstar utilizado neste estudo.

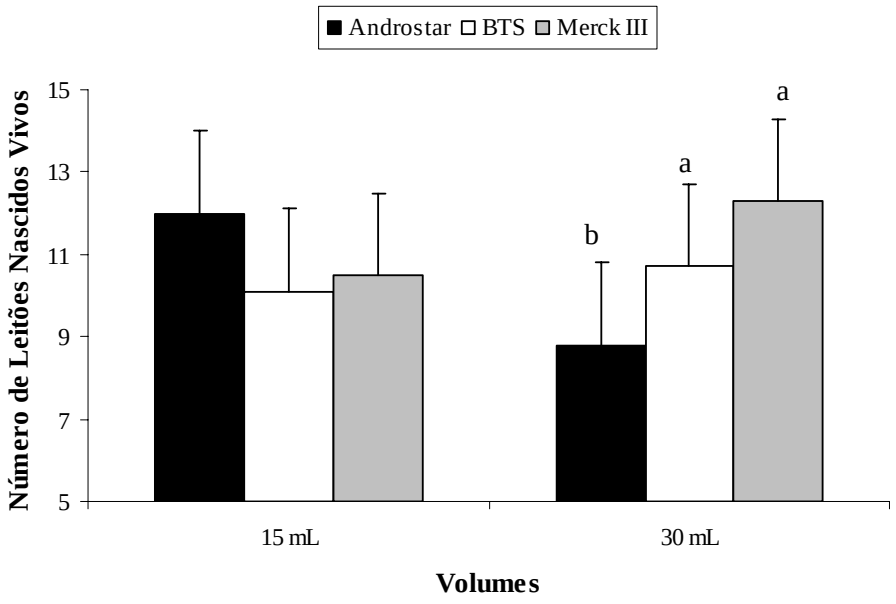

FIGURA 1. Médias do número de leitões nascidos vivos de fêmeas inseminadas com doses de 15 e 30 mL, utilizando-se diferentes diluentes (Androstar, BTS e Merck III). [a,b]Letras diferentes dentro de um mesmo volume inseminante implicam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey (P<0,05)

Considerando o diluente de curta duração BTS, o mesmo utilizado no presente estudo e no experimento de Vasconcelos et al. (2001), os valores aqui encontrados foram superiores. Estas diferenças talvez sejam devido às diferentes metodologias utilizadas, mostrando as possíveis influências do número de espermatozóides (1,5 bilhão vs 5 bilhões), do volume inseminante (15 ou 30 mL vs 100 mL) e, conseqüentemente, da técnica de inseminação (intra-uterina vs

tradicional) sobre a prolificidade das fêmeas. Segundo Baker et al. (1968), o tempo de conservação e o número de espermatozóides por dose inseminante influenciam as respostas reprodutivas.

No trabalho de Dallanora et al. (2004), no qual as doses destinadas à inseminação intra-uterina das matrizes suínas continham 1,5 bilhão de espermatozóides em 60 mL de BTS, o número total de leitões nascidos foi de 11,6±2,60, enquanto que, no presente experimento, foram encontrados valores menores (10,8±0,78 para os volumes de 15 mL) e maiores (12,1±0,78para os de 30 mL) que daquele.

Na Figura 2 são apresentadas as médias do número total de leitões nascidos das fêmeas inseminadas.

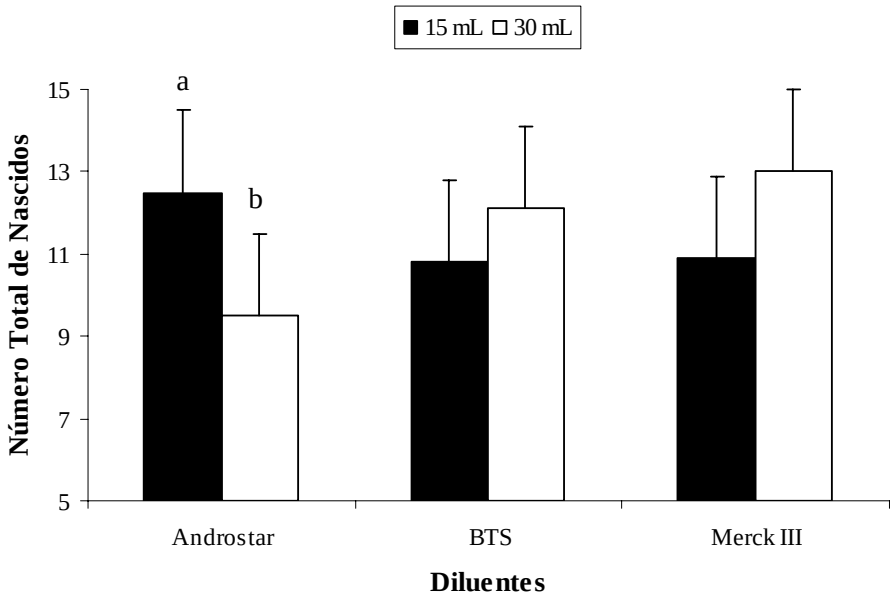

FIGURA 2. Médias do número total de leitões nascidos de fêmeas inseminadas com sêmen de suíno diluído nos diluentes Androstar, BTS e Merck III, constituindo doses de 15 e 30 mL. [a,b]Letras diferentes dentro de um mesmo diluente implicam diferenças estatísticas, pelo teste de Tukey (P<0,05)

Não houve diferenças entre os volumes dentro dos diluentes BTS e Merck III (P>0,05). Para o diluente Androstar, o volume que proporcionou maior tamanho de leitegada foi o de 15 mL (P<0,05).

Os valores médios do número de leitões natimortos e mumificados presentes nas leitegadas das fêmeas que foram inseminadas no experimento são apresentados na Tabela 4.

Com relação ao número de natimortos e mumificados, os valores não diferiram entre os diluentes e volumes utilizados (P>0,05) e estão dentro dos valores preconizados tanto para natimortos (de 0,67 a 1 leitão por leitegada) quanto para mumificados (de 0,11 a 0,58 leitão por leitegada), para ambas as técnicas (tradicional e intra-uterina) utilizadas na deposição do sêmen (Wentz et al., 2006).

TABELA 4. Médias e erros-padrão do número de leitões natimortos e mumificados presentes nas leitegadas das fêmeas inseminadas intra-uterinamente, com doses de 15 e 30 mL diluídas em Androstar, BTS e Merck III

Diluente	Volume (mL)		Média
	15	30	
	Número de Leitões Natimortos		
Androstar	0,36 ±0,19	0,29±0,19	0,32±0,13
BTS	0,70±0,19	1,00±0,19	0,85±0,13
Merck III	0,45±0,19	0,64±0,19	0,55±0,13
Média	0,51±0,12	0,64±0,12	P = 0,16
	Número de Leitões Mumificados		
Androstar	0,18±0,17	0,42±0,17	0,30±0,12
BTS	0,00±0,00	0,36±0,17	0,18±0,12
Merck III	0,00±0,00	0,13±0,17	0,06±0,12
Média	0,06±0,11	0,30±0,11	P = 0,89

*Não significativo ao teste de qui-quadrado (P>0,05)

O número de natimortos observados na tabela acima foi inferior aos encontrados na maioria dos trabalhos. Toniolli & Mesquita (1990), utilizando doses de 3 bilhões de espermatozóides em 100 mL de BTS, encontraram 6,20%

de leitões natimortos. Este valor, apesar de estar dentro dos valores aceitáveis (4,80% a 9,00%), foi bem maior que os encontrados neste trabalho.

A distribuição da natimortalidade entre fêmeas segue um caráter normal, com a maioria das fêmeas freqüentemente parindo um pequeno número de natimortos, enquanto que poucas matrizes apresentam taxas elevadas. Dentre os fatores envolvidos associados à presença de natimortos, podem ser citados: ordem de parto, tamanho da leitegada, duração do parto, escore corporal visual, auxílio ao parto (toque vaginal), peso da leitegada, presença de mumificados na leitegada, intervalo entre os nascimentos dos leitões, peso ao nascer e fatores estressantes, além das causas infecciosas (Wentz et al., 2006).

A extensão das perdas fetais que culminam em mumificados é da ordem de 0,50% a 1,50%, em média, por leitegada. Wentz et al. (2006) sugerem que existem duas causas principais prováveis para a ocorrência de mumificação fetal: a falta de espaço uterino, com descolamento precoce de placenta e doenças de caráter progressivo no útero, capazes de causar a morte de vários fetos na mesma leitegada. Estes autores também relatam que a mortalidade fetal em suínos, principalmente a mumificação, tem aumentado, devido ao aumento na taxa de ovulação e a provável limitação da capacidade uterina. O tamanho da leitegada também pode ser considerado um fator de risco para mumificados; quanto maior a leitegada, maior a taxa de leitões mumificados.

Os resultados de peso médio da leitegada ao nascimento são apresentados na Tabela 5.

Não houve diferenças entre os diluentes utilizados quando as doses foram de 15 mL ($P>0,05$). Dentro de um mesmo diluente, as médias encontradas foram similares, independente do volume de 15 ou 30 mL, para ambos os diluentes utilizados no presente estudo ($P>0,05$).

TABELA 5. Médias e erros-padrão do peso da leitegada ao nascer (kg) das fêmeas inseminadas intra-uterinamente com doses de 15 e 30 mL, utilizando-se diferentes diluentes

Diluente	Volume (mL)		Média
	15	30	
Androstar	17,71±1,05	14,90±1,05 **B**	16,29±0,74
BTS	16,27±1,05	18,50±1,05 **A**	17,40±0,74
Merck III	16,24±1,05	18,00±1,05 **AB**	17,12±0,74
Média	16,74±0,60	17,13±0,60	
P = 0,03			CV = 21,56%

[1]Médias seguidas de diferentes letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas diferem (P<0,05) pelo teste Tukey

Em concordância com as variáveis número total de leitões nascidos e número de leitões nascidos vivos, as maiores médias de pesos de leitegada ao nascimento foram provenientes de leitegadas de fêmeas inseminadas com doses diluídas em BTS e Merck III, seguidas pelas leitegadas de fêmeas inseminadas com doses diluídas em Androstar (P<0,05).

Dimitrov et al. (2007), ao testarem doses inseminantes de 1,5 bilhão de espermatozóides em 50 mL de BTS destinadas à inseminação intra-uterina, encontraram pesos médios de leitegada de 16,08 kg, valor inferior aos resultados encontrados no presente estudo, tanto para as doses de 15 mL quanto para as de 30 mL diluídas em BTS. Esta diferença pode ser atribuída ao fato de que, além de os volumes utilizados terem sido diferentes, estes autores utilizaram fêmeas com intervalo desmame-cio superior a seis dias, o que, segundo os próprios autores, resulta em tamanho e peso de leitegadas menores.

Vale ressaltar que, baseado nos resultados *in vivo*, diferenças foram encontradas entre os variados diluentes e volumes inseminantes, mas, nem sempre é possível relatar as diferenças inerentes ao tipo de diluente ou volume utilizado. Diferenças no desenho do experimento (número total de espermatozóides por dose inseminante, número de inseminações, raça ou linhagens utilizadas, tipo de técnica de inseminação, etc.), fazem com que se

torne mais difícil comparar os experimentos e apontar conclusões diretas sobre o tipo de diluente e o volume inseminante mais favoráveis à fertilização das fêmeas suínas, quando se utiliza a técnica de inseminação intra-uterina.

4 Conclusões

A inseminação intra-uterina de fêmeas suínas de ordem de parto dois a cinco, com doses inseminantes de 15 e 30 mL diluídas em BTS ou Merck III, permitem índices satisfatórios de desempenho reprodutivo.

Em casos da utilização do diluente Androstar na inseminação intra-uterina, em detrimento dos diluentes de curta duração, recomenda-se a utilização de volume inseminante de 15 mL.

5 Referências Bibliográficas

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

BEHAN, J.R.; WATSON, P.F. A commercially based field trial to investigate trans-cervical insemination at reduce volume and sperm concentration in sows. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15., 2004, Porto Seguro. **Proceedings...** Porto Seguro, BA: CBRA, 2004. p.573.

BENNEMANN, P.E.; MILBRADT, E.; DIEHL, G.N.; WEBER, D.; SCHIMIDT, A.C.T.; BERNARDI, M.L.; WENTZ, I.; BORTOLOZZO, F.P. Reproductive performance of soes submitted to intrauterine insemination at different pré-ovulatory intervals. **Animal Reproduction**, v.1, n.1, p.106-110, 2004.

BORTOLOZZO, F.P.; BERNARDI, M.L.; WENTZ, I. Perspectiva do emprego da inseminação artificial intra-uterina em suínos. In: CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 12., 2005, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza, CE: ABRAVES**,** 2005a. v. 1. p. 36-47.

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

DALLANORA, D.; MEZALIRA, A.; KATZER, L.H.; BERNARDI, M.L.; BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I. Desempenho reprodutivo de fêmeas suínas inseminadas pela técnica intra-uterina ou tradicional. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.8, p.815-819, 2004.

DIMITROV, F.; DIMITROV, M.; DIMITROV, S.; HERNANDEZ-GIL, R.; RUVALCABA, J.A.G. **Inseminación post-cervical en hembras multíparas con concentración reducida de espermatozoides por dosis:** resultados de campo en Bulgaria. Disponível em: <http://64.233.169.104/search?q=cache: uGg4tAqwO3wJ:ww.avancesentecnologiaporcina.com/contenidos/insene7.htm+ inseminacion+post+cervical+gil&hl=pt-BR&ct=clnk&cd=4. Acesso em: 25 abr. 2007.

JAINUDEEN, M.R.; HAFEZ, E.S.E. Falha reprodutiva em fêmeas. In: HAFEZ, E.S.E. (Ed.). **Reprodução animal**. São Paulo: Manole, 2004. cap. 17, p. 261-278.

RATH, D. Low dose insemination in the sow – a review. **Reproduction in Domestic Animals**, v.37, p.201-205, 2002.

RATTO, J.; JOKINEN, L. Reports about number of swine inseminations and farrowing results in Finland 1989, comparison between two diluents EDTA and MR-A. **Reproduction in Domestic Animals**. Supplement, v.1, p.365-368, 1990.

REIS, F.T. Colheita, avaliação e manipulação do ejaculado de suínos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.21, n.3, p.22-29, 1997.

REVELL, S.G.; GLOSSOP, C.E. A long-time ambient temperature diluent for boar semen. **Animal Production**, v.48, p.579-584, 1989.

SAEG. **Sistemas para análises estatísticas**. Versão 5.0. Viçosa: Fundação Arthur Bernardes, 1993. Software.

SCHEID, I.R. **Inseminação artificial em suínos:** diluentes para a conservação do sêmen no estado líquido. Concórdia: EMBRAPA/CNPSA, 1991. 5p. (EMBRAPA/CNPSA. Comunicado Técnico, 12).

TONIOLLI, R.; MESQUITA, D.S.M. Fertilidade de porcas inseminadas com sêmen diluído em água de coco estabilizada e com BTS. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.14, n.4, p.249-254, 1990.

VASCONCELOS, A.M.M.A.; MORAES, G.V.; RIGOLON, L.P.; MOREIRA, I.; MARTINS, E.N. Efeito de sêmen resfriado e diluído em Beltsville Thawing Solution, Zorlesco-Modificado e BTZOR no desempenho reprodutivo de fêmeas suínas inseminadas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.2, p.402-408, 2001.

WENTZ, I.; CYPRIANO, C.R.; VARGAS, A.J.; BERNARDI, M.L.; BORTOLOZZO, F.P. Fatores de risco para leitões natimortos e mumificados. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE SUINOCULTURA, 3., 2006, Foz do Iguaçu, **Anais...** Foz do Iguaçu, PR: Embrapa 2006. p. 271-288.

WILLIAMS, S. **Inseminación artificial post cervical**. Porcicultura.com. Disponível em: <http://www.porcinocultura.com>. Acesso em: 25 abr. 2007.

ANEXOS

TABELA 1A. Análise de variância e coeficiente de variação para motilidade espermática do sêmen suíno diluído em diferentes diluentes (Androstar, BTS e Merck III) e volumes inseminantes (15, 20, 25 e 30 mL)..... 69

TABELA 2A. Análise de variância e coeficiente de variação para número total de leitões nascidos de fêmeas inseminadas intra-uterinamente com volumes de 15 e 30 mL conservados em diferentes diluentes (Androstar, BTS e Merck III)..... 70

TABELA 3A. Análise de variância e coeficiente de variação para número de leitões nascidos vivos de fêmeas inseminadas com doses inseminantes de 15 e 30 mL diluídas em Androstar, BTS e Merck III..... 70

TABELA 4A. Análise de variância e coeficiente de variação para peso da leitegada ao nascer de fêmeas inseminadas intra-uterinamente com volumes de 15 e 30 mL conservados em diferentes diluentes (Androstar, BTS e Merck III)..... 71

TABELA 1A. Análise de variância e coeficiente de variação para motilidade espermática do sêmen suíno diluído em diferentes diluentes (Androstar, BTS e Merck III) e volumes inseminantes (15, 20, 25 e 30 mL)

FV	GL	SQ	QM	F	P>F
Bloco	11	9236,168919	839,652	9,514	0,0000
Tratamento	36	66590,22523	1849,728	20,958	0,0000
Diluente (D)	2	4212,50463	2106,252	23,865	0,0000
Volume (V)	3	236,5	78,833	0,893	0,4468
D*V	6	1274,458333	212,410	2,407	0,0312
D dentro V1	*2*	*642,796296*	*321,398*	*3,642*	*0,0291*
D dentro V2	*2*	*252,907407*	*126,454*	*1,433*	*0,2427*
D dentro V3	*2*	*1637,907407*	*818,954*	*9,279*	*0,0002*
D dentro V4	*2*	*2953,351852*	*1476,676*	*16,731*	*0,0000*
V dentro D1	*3*	*28,520833*	*9,507*	*0,108*	*0,9554*
V dentro D2	*3*	*357,472222*	*119,157*	*1,350*	*0,2614*
V dentro D3	*3*	*1124,965278*	*374,988*	*4,249*	*0,0068*
Linear	*1*	*842,834722*	*842,835*	*9,550*	*0,0025*
Quadrático	*1*	*95,0625*	*95,063*	*1,077*	*0,3014*
Desvio	*1*	*187,068056*	*187,068*	*2,120*	*0,1480*
erro A	121	10679,1481	88,257		
Tempo (T)	2	54145,03241	27072,516	379,942	0,0000
T*D	4	1780,592593	445,148	6,247	0,0001
D dentro T1	*2*	*26,166667*	*13,083*	*0,184*	*0,8323*
D dentro T2	*2*	*2990,888889*	*1495,444*	*20,987*	*0,0000*
D dentro T3	*2*	*2976,041667*	*1488,021*	*20,883*	*0,0000*
T dentro D1	*2*	*11845,26389*	*5922,632*	*83,120*	*0,0000*
T dentro D2	*2*	*19409,68056*	*9704,840*	*136,200*	*0,0000*
T dentro D3	*2*	*24670,68056*	*12335,340*	*173,117*	*0,0000*
T*V	6	270,208333	45,035	0,632	0,7046
T*D*V	12	1300,333333	108,361	1,521	0,1137
Adicional	1	3370,5956	3370,596	47,304	0,0000
erro B	396	28216,74775	71,254		
CV 1 (%)	12,37				
CV 2 (%)	10,64				

TABELA 2A. Análise de variância e coeficiente de variação para número total de leitões nascidos de fêmeas inseminadas intra-uterinamente com volumes de 15 e 30 mL conservados em diferentes diluentes (Androstar, BTS e Merck III)

FV	GL	SQ	QM	F	P>F
Diluente (D)	2	10,936358	5,468179	0,749	0,4769
Volume (V)	1	0,295168	0,295168	0,040	0,8413
D*V	2	93,027936	46,513968	6,370	0,0030
V dentro 1	*1*	55,906538	55,906538	7,656	0,0073
V dentro 2	*1*	10,322817	10,322817	1,414	0,2387
V dentro 3	*1*	27,093750	27,093750	3,710	0,0584
D dentro 1	*2*	23,266756	11,633378	1,593	0,2077
D dentro 2	*2*	80,697539	40,348769	5,525	0,0058
erro	66	481,962125	7,302456		
CV (%)	23,55				

TABELA 3A. Análise de variância e coeficiente de variação para número de leitões nascidos vivos de fêmeas inseminadas com doses inseminantes de 15 e 30 mL diluídas em Androstar, BTS e Merck III

FV	GL	SQ	QM	F	P>F
Diluente (D)	2	14,829519	7,414760	1,283	0,2840
Volume (V)	1	1,105089	1,105089	0,191	0,6633
D*V	2	82,967336	41,483668	7,178	0,0015
V dentro 1	*1*	61,760417	61,760417	10,686	0,0017
V dentro 2	*1*	2,528504	2,528504	0,438	0,5106
V dentro 3	*1*	19,783504	19,783504	3,423	0,0688
D dentro 1	*2*	24,894617	12,447308	2,154	0,1217
D dentro 2	*2*	72,902239	36,451119	6,307	0,0030
erro	66	381,433450	5,779295		
CV (%)	22,42				

TABELA 4A. Análise de variância e coeficiente de variação para peso da leitegada ao nascer de fêmeas inseminadas intra-uterinamente com volumes de 15 e 30 mL conservados em diferentes diluentes (Androstar, BTS e Merck III)

FV	GL	SQ	QM	F	P>F
Diluente (D)	2	15,785358	7,892679	0,592	0,5561
Volume (V)	1	2,832200	2,832200	0,212	0,6464
D*V	2	94,503308	47,251654	3,544	0,0345
V dentro 1	*1*	48,081704	48,081704	3,606	0,0619
V dentro 2	*1*	30,668204	30,668204	2,300	0,1341
V dentro 3	*1*	18,585600	18,585600	1,394	0,2420
D dentro 1	*2*	16,999850	8,499925	0,638	0,5285
D dentro 2	*2*	93,288817	46,644408	3,499	0,0350
erro	66	879,945283	13,332504		
CV (%)	21,56				

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo