



## Situação atual da inseminação artificial em suínos

Present situation of artificial insemination in swine

Fernando Pandolfo Bortolozzo<sup>1</sup>, Ivo Wentz<sup>1</sup> & Djane Dallanora<sup>1</sup>

### RESUMO

A inseminação artificial na espécie suína trouxe benefícios pela difusão rápida de características desejáveis no rebanho como a melhora de ganho de peso e conversão alimentar, menor deposição de gordura e melhor qualidade de carcaça, melhor aproveitamento de machos geneticamente superiores e redução dos custos de produção. Essas características permitiram a grande difusão da biotécnica na suinocultura intensiva e tecnificada. Nos últimos 30 anos, poucas modificações foram feitas na realização da diluição e técnica de inseminação propriamente dita. Porém, existiram progressos no desenvolvimento de novos equipamentos para conservação do sêmen e utilização de materiais descartáveis na produção das doses. Atualmente, o foco da pesquisa está direcionado à redução no número de espermatozoides por dose, deposição do sêmen intra-uterinamente e modulação da fagocitose das células espermáticas no trato genital feminino. Esse artigo apresenta uma revisão referindo-se aos progressos já alcançados e às perspectivas de utilização de novas tecnologias na área de manejo reprodutivo em suínos, principalmente visando a possibilidade de redução do número de espermatozoides/fêmea/ano.

**Descritores:** inseminação artificial, suínos, reprodução.

### ABSTRACT

The artificial insemination has improve in pig production optimizing the use of boars, increasing in daily weight gain and meat quality, decreasing of body fat and reducing the costs of production. These aspects stimulated the diffusion of this biotechnology in farm conditions. In the last thirty years, few alterations were made concerning semen dilution technique and insemination method. However, there was progress in developing new equipments for boar semen conservation and use of disposable materials in handling of semen. Nowadays, the focus of research works is related with reduction of number of spermatozoa per dose, deposition of sperm in uterine body/horn and modulation of phagocytosis in the female genital tract. This review presents the main progress already fulfilled and perspectives about utilization of new technologies in swine reproductive management, concerning the reduction of number of spermatozoa/female/year.

**Key words:** artificial insemination, swine, reproduction.

## I. INTRODUÇÃO

## II. PROGRESSOS NA CONSERVAÇÃO DO SÊMEN SUÍNO

1. Progressos no processamento de sêmen resfriado
2. Congelação de sêmen suíno

## III. APROXIMAÇÃO DA IA AO MOMENTO DA OVULAÇÃO E RESULTADOS DE FERTILIDADE

## IV. REDUÇÃO DO NÚMERO DE ESPERMATOZÓIDES/FÊMEA/ANO E INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

1. Otimização do manejo dos machos da CIA
2. Inseminação intra-uterina
3. Minimização das perdas de espermatozóide durante e após a IA
  - 3.1 Perdas por refluxo
  - 3.2 Perdas por fagocitose

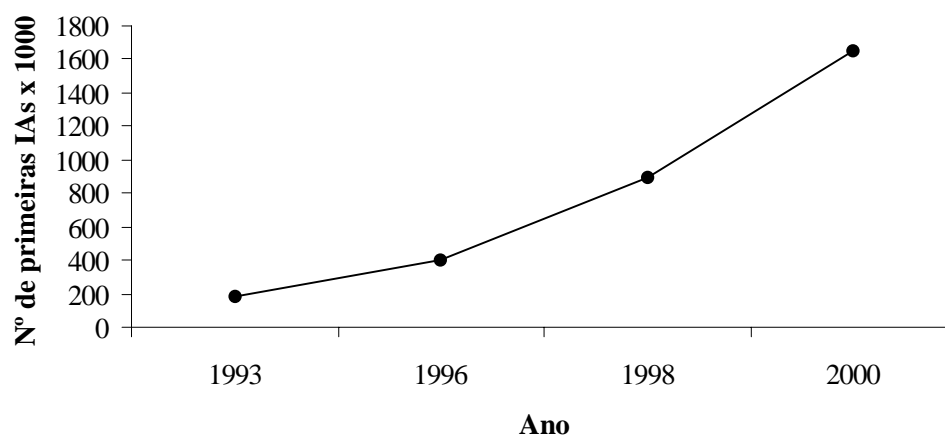
## V. ANÁLISE E DILUIÇÃO DE SÊMEN PARA PRODUÇÃO DE DOSES COM REDUZIDO NÚMERO DE ESPERMATOZÓIDES

## VI. CONCLUSÕES

### I. INTRODUÇÃO

A suinocultura moderna e tecnificada cada vez mais utiliza a inseminação artificial (IA) como componente do manejo reprodutivo. A grande difusão da IA deveu-se principalmente ao surgimento de linhagens genéticas de machos terminais que agregaram às carcaças de seus descendentes as qualidades exigidas pela tipificação instituída na indústria de carnes. A necessidade de atender as exigências do mercado consumidor no que diz respeito à qualidade da carne e teor de gordura na carcaça foi a principal responsável pelo progresso genético nessa área, na espécie suína.

Segundo a ABIPECS/ABCS [1], o rebanho de matrizes no Brasil manteve-se estável nos últimos seis anos, ficando num patamar de aproximadamente 2,2 milhões de animais (1996-2001), sendo 1,2 a 1,3 milhões alojada em granjas tecnificadas. Baseando-se numa projeção de venda de embalagens das doses inseminantes comercializadas pelas diferentes empresas do setor durante o ano 2000, Wentz *et al.* [44] estimaram que 51% do plantel das granjas tecnificadas está sendo submetido à IA, observando que o número de fêmeas inseminadas aumentou ano a ano (Figura 1).



**Figura 1.** Evolução do número de primeiras IAs no Brasil. Wentz *et al.* [44].

Inúmeras vantagens levaram à ampla difusão da IA. Dentre elas pode-se citar: ganhos genéticos com o emprego de machos geneticamente superiores, redução nos custos de cobertura, melhor aproveitamento das instalações, maior segurança sanitária maiores cuidados higiênicos nas coberturas, eliminação dos ejaculados impróprios para uso e evolução técnica da equipe na implantação do emprego dessa tecnologia [18,44] Apesar de todas essas marcantes vantagens, a IA suína tem algumas limitações. Segundo Bortolozzo e Wentz [7], em programas fechados, onde ocorre a instalação de uma unidade de produção de sêmen na própria granja, é necessário um investimento inicial na construção e equipamento da mesma, bem como no treinamento e capacitação técnica da equipe envolvida na produção das doses de sêmen. Os mesmos autores ainda citam que nos programas abertos, onde as doses são adquiridas de centrais externas à granja, a limitação principal fica condicionada à comunicação e ao transporte das doses. As vantagens no emprego dessa biotécnica são tão evidentes que, apesar das limitações aqui descritas, pode-se afirmar que atualmente a IA em suínos representa uma tecnologia sólida com aplicabilidade comercial que faz parte da rotina de produção de granjas tecnificadas.

Atualmente, a pesquisa em IA da espécie suína está direcionada a três grandes áreas: progressos na conservação do sêmen, momento ideal para realização da deposição espermática no trato genital feminino e redução do número de espermatozoides/fêmea/ano.

## **II. PROGRESSOS NA CONSERVAÇÃO DO SÊMEN SUÍNO**

### **1. Progressos no processamento de sêmen resfriado**

Nos últimos 15 anos, ocorreu uma maior compreensão e aceitação dos procedimentos para a preparação das doses inseminantes juntamente com uma grande disponibilização de equipamentos por parte das indústrias associadas ao agronegócio da IA, o que corroborou com uma melhora significativa na qualidade das doses e com uma maior popularização desta tecnologia.

Com a melhora da oferta de equipamentos no mercado e a necessidade da correta utilização dos mesmos, houve uma sensível melhora técnica do quadro funcional das equipes de IA e diagnóstico de estro das granjas, devido aos treinamentos intensivos e

reciclagens constantes, tornando-os altamente capacitados para o desempenho específico das suas funções, bem como cientes de sua responsabilidade em produzir doses de alta qualidade na rotina diária, para culminar com o sucesso de todo o processo. A qualificação também estende-se aos profissionais médicos veterinários que atualmente recebem uma melhor abordagem do tema dentro das Universidades e já chegam ao mercado de trabalho mais preparados para trabalhar na área.

No início, faltavam pessoas com conhecimentos e capacidade de implementar a técnica em larga escala e os equipamentos eram escassos, hoje o que é visto são pessoas com noções claras de IA e tecnologia do sêmen e laboratórios equipados com condições de produzir doses de melhor qualidade.

O emprego de materiais descartáveis, desde a coleta até a infusão da dose inseminante, proporciona um menor nível de contaminação do sêmen, tanto biológica (bactérias) como química (resíduos de detergente provenientes da lavagem, por exemplo), melhorando a qualidade da dose inseminante. Os sacos de coleta colocados no copo coletor ou o uso de copos descartáveis, luvas de coleta, garrafas e bisnagas, pipetas de IA, enfim, praticamente todos os materiais utilizados na produção, armazenamento e aplicação da dose inseminante existem, disponíveis no mercado, sob a forma descartável e a preços acessíveis [9].

A garantia de qualidade dos diluentes atualmente comercializados, reconhecidos pelo Ministério da Agricultura, e a disponibilidade de produtos destinados a diferentes períodos de armazenamento também contribuem para uma maior qualidade e potencial fecundante da dose inseminante (qualidade e viabilidade dos espermatozoides). O desenvolvimento de diluentes chamados de “longa duração” recomendados para a produção de doses com um período de validade maior, surgiu como opção para granjas que recebem sêmen em intervalos superiores há três dias e distantes das Centrais de Inseminação Artificial (CIAs) ou solucionando problemas de fornecimento em feriados [7].

Além da adequação do período de armazenamento ao diluente utilizado, o desenvolvimento de conservadoras exclusivamente para armazenamento de sêmen, as quais permitem a manutenção adequada e uniforme da temperatura interna ao longo do dia, tornou possível a estocagem das doses inseminantes sem prejuízos à qualidade dos esperma-

tozóides, dentro do prazo de validade estipulado. Com essa adequação do ambiente de armazenamento, são reduzidos os danos pelas possíveis oscilações de temperatura e mantém-se a condição de anabiose, sem desperdício de energia pela célula espermática durante esse período. Outros procedimentos básicos como a homogeneização da dose inseminante pelo menos uma vez ao dia, manutenção da higiene do conservador, acompanhamento da temperatura interna do conservador e das caixas de transporte de sêmen através de termômetro de máxima e mínima, controle diário da motilidade na CIA e na granja onde o sêmen será utilizado colaboram para que a inseminação seja realizada com uma dose inseminante com condições ótimas de fecundação [9].

## 2. Congelamento de sêmen suíno

A técnica de criopreservação de sêmen suínos é bem conhecida e, embora tenha sofrido várias modificações nos últimos trinta anos, continua basicamente a mesma descrita por Westendorf *et al.* [47].

Apesar dos avanços das embalagens e diferentes volumes, Hofmo e Almlid [23] citam que se observa uma diminuição dos índices reprodutivos da ordem de 10-20% na taxa de parição e 1-3 leitões no tamanho da leitegada das fêmeas inseminadas com sêmen congelado/descongelado (Tabela 1). Essas consequências negativas sobre o desempenho reprodutivo devem-se, basicamente, ao declínio da motilidade, perda da integridade da membrana plasmática, degeneração do acrossoma e redução da atividade metabólica da célula, as quais influenciam a capacidade fecundante do espermatozóide e sua viabilidade no trato genital feminino [15].

Sob o aspecto econômico e prático, a utilização da criopreservação aumenta os custos por fêmea

inseminada e dose produzida, já que é necessário praticamente dobrar o número de espermatozóides por dose (em média, 5 bilhões contra 2 a 3 na dose tradicionalmente utilizada), reduzindo o rendimento dos ejaculados. Além disso, a técnica de conservação é relativamente demorada e complexa, sendo necessárias 7-9 horas para o processamento de um ejaculado [24,43]. A redução do desempenho reprodutivo e as dificuldades no processamento fazem com que o emprego de sêmen congelado fique restrito à comercialização de doses por longas distâncias e ao campo experimental.

## III. APROXIMAÇÃO DA IA AO MOMENTO DA OVULAÇÃO E RESULTADOS DE FERTILIDADE

Sob condições práticas, a definição do momento da primeira IA estará associada ao início do estro. Preconiza-se que a primeira IA seja realizada antes da ovulação. Em rebanhos que realizam dois diagnósticos de estro ao dia, observou-se que, entre 12 e 20 horas após o início do estro, 5,5% [22] a 7,7% [14] das porcas havia ovulado. No caso de leitoas esse índice variou de 12,8% [29] a 20,6% [41]. Nesse caso, preconiza-se a primeira IA 8-16 horas após a detecção do início do estro, ou seja, no turno seguinte [8]. Nas unidades que realizam uma detecção de estro diária, um grande percentual de fêmeas já pode ter ovulado ou estar em processo de ovulação no momento em que o estro é detectado. Nesse caso, a primeira IA deve ser realizada no momento em que o início do estro é diagnosticado [8]. Esse procedimento é recomendado para porcas, sendo válido também para leitoas. Entretanto, sabe-se que a duração do estro nesta categoria é mais curta, conseqüentemente o intervalo início do estro ovulação é menor. Essas características, associadas a possíveis falhas no diagnóstico de estro em leitoas, fazem com que muitas unidades, mesmo as que realizam dois diag-

**Tabela 1.** Desempenho reprodutivo de fêmeas inseminadas com sêmen congelado.

Autores	Embalagem	Dose bilhões	Taxa de prenhez %	Taxa de parto %	Nº de leitões nascidos
Gil <i>et al.</i> [20]	Macrotubos 5 mL	5	91,4	87,5	10,5 NT 9,4 NV
Mileham <i>et al.</i> [32]	Palhetas 0,5 mL	6	81,0	69,0	9,1 NT
Woelders [48]	Bolsas 8 mL	4	47,0	44,0	7,2 NV
Eriksson e Rodriguez-Martinez [16]	Bolsas 5 mL	5	-	75,0	10,6 NT 9,4 NV

NT= total de leitões nascidos; NV= leitões nascidos vivos. Bernardi e Ohata [4].

nósticos de estro ao dia, procedam com a primeira inseminação no momento em que o estro inicia.

Vários fatores influenciam o período em que uma população espermática permanece viável no trato genital feminino após a IA. Dentre outros, pode-se citar a variação individual entre doadores, as diferenças entre ejaculados do mesmo doador, aspectos associados a qualidade no processamento das doses de sêmen, tempo de armazenamento *in vitro* das doses e a qualidade no transporte e armazenamento das doses. Vários trabalhos realizados com fêmeas multíparas têm demonstrado que a população espermática permanece viável, de uma maneira geral, por um período de até 24 horas [33,38]. Com a tecnologia disponível até o momento e devido à grande variação individual, não é possível prever o momento da ovulação e isso faz com que, sob condições práticas, seja necessário realizar inseminações repetidas durante o estro, para que, pelo menos uma delas seja realizada no período de até 24 horas antes da ovulação. Levando em consideração o período de sobrevivência espermática, passou-se a pesquisar a possibilidade de realizar apenas uma IA ao dia em fêmeas multíparas. Castagna [10] desenvolveu um trabalho, em duas propriedades, onde multíparas foram inseminadas em intervalos de 24 horas (uma vez ao dia) comparada a IA em intervalos de 12 horas (duas vezes ao dia). Em ambos os grupos, a primeira IA foi realizada no turno seguinte ao início do estro. Neste trabalho foram empregadas doses de sêmen contendo  $3 \times 10^9$  de espermatozoides, armazenadas por um período máximo de 48 horas após a diluição. O desempenho reprodutivo das pluríparas não foi influenciado pela realização de uma ou duas inseminações ao dia (Tabela 2). Com o manejo de uma IA diária, ocorreu uma redução de 35% no número de

inseminações realizadas, sem prejuízos ao desempenho reprodutivo do rebanho. Entretanto, ao se recomendar uma IA ao dia em pluríparas, é importante estar atento às características qualitativas e quantitativas das doses de sêmen empregadas, principalmente devido às grandes variações observadas em doses oriundas de diferentes centrais de IA. Bennemann [3] avaliou a motilidade espermática de doses inseminantes provenientes de 5 Centrais de Inseminação Artificial (CIAs) durante 96 horas de armazenamento (Figura 2). O resultado dessa avaliação demonstrou uma grande variabilidade da qualidade das doses inseminantes produzidas nas CIAs avaliadas. Nessa análise, possivelmente, somente duas CIA's, das cinco avaliadas, teriam condições de fornecer doses inseminantes para um programa de IA com intervalos de 24 horas.

No caso de leitoas, as inseminações devem ser realizadas preferencialmente em um período de até 16 horas antes da ovulação. Bortolozzo *et al.* [6] observaram que inseminações realizadas nas 24 horas que antecedem a ovulação não afetam o número de embriões normais aos 32 dias de gestação e a sobrevivência embrionária. Entretanto, IAs realizadas em intervalos superiores a 16 horas antes da ovulação levaram a um aumento na taxa de retorno ao estro.

Com o emprego da ultra-sonografia para o exame de ovários em suínos, foi possível estudar detalhadamente aspectos associados à fisiologia reprodutiva da fêmea de forma não invasiva. Os primeiros trabalhos já demonstraram uma grande variação individual no intervalo entre o início do estro e a ovulação [46]. Posteriormente, ao longo dos anos noventa, foram realizados vários estudos visando identificar um preditor do momento da ovulação para poder aproximar, na prática, a IA da ovulação. Apesar dos

**Tabela 2.** Desempenho reprodutivo de fêmeas suínas submetidas a uma ou duas inseminações por dia durante o estro.

	1 IA/dia	2 IA/dia	NS
Número de matrizes	1.110	1.112	-
Taxa de Retorno ao Estro	7,64	5,82	0,087
Taxa Parto Ajustada	89,68	92,05	0,055
Leitões Nascidos Totais	11,01±3,12	11,01±2,96	0,2600
Nº IA/cobertura	2,13±0,50	3,32±0,76	0,0001
Nº Leitões/100 coberturas	1.061,81	1.084,68	0,1501

NS= nível de significância. Castagna [10].

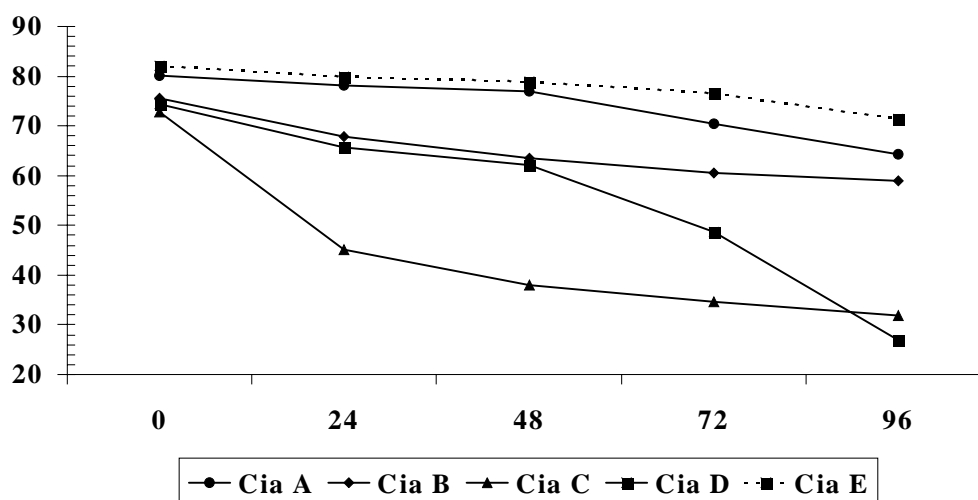


Figura 2. Motilidade espermática de doses de sêmen produzidas em 5 centrais de inseminação artificial na região Sul do Brasil.

esforços, até o momento não foi possível identificar um preditor da ovulação na espécie. Entretanto, foi descoberto que a duração do estro está associada com o intervalo início do estro-ovulação [38], sendo que a ovulação tende ( $R^2=0,50$  a  $0,60$ ) a ocorrer no início do terço final do estro. Paralelo a isso, foi observado uma associação negativa entre o intervalo desmame estro (IDE) e a duração do estro [25,35,46]. Kemp e Soede [25] observaram que um aumento de 3 dias na duração do IDE resultou em uma redução próxima a 24 horas na duração do estro. Com isso fêmeas com IDE curto teriam, por exemplo, estro longo e, conseqüentemente, um intervalo início do estro-ovulação mais longo. Baseado nessa associação existente entre o IDE e a duração do estro, Weitze *et al.* [46] recomendaram um protocolo de IA que foi amplamente divulgado e difundido. Os autores propuseram que as fêmeas com IDE curto (3-4 dias) teriam a primeira IA postergada, pois tenderiam a ter estro mais longo e ovulariam mais tardiamente. As fêmeas com IDE longo (>6 dias) tenderiam a ter um estro mais curto, conseqüentemente ovulariam mais cedo. Nesse caso foi preconizada uma IA logo após a detecção do início do estro. Entretanto, trabalhos subseqüentes indicaram que a associação entre o intervalo desmame-estro e a duração do estro apresentou um coeficiente de determinação que variou entre 0,11 e 0,26, ou seja de 11% a 26% da variação observada na duração do estro foi explicada pelo IDE [5].

Também foram observadas variações entre granjas e na própria granja em momentos diferentes de observação [5] além de propriedades onde essa associação não foi observada [10,14,22,38]. Assim, um protocolo de IA elaborado de acordo com o IDE não deve ser usado sem antes conhecer o perfil de IDE e duração de estro de cada granja, sob pena de influenciar negativamente o desempenho reprodutivo.

#### IV. REDUÇÃO DO NÚMERO DE ESPERMATOZÓIDES / FÊMEA / ANO E INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

O método tradicionalmente empregado na IA em suínos preconiza a utilização de uma pipeta, que mimetiza a extremidade do pênis do cachaço, permitindo a deposição do sêmen no canal cervical [42]. Para realizar a IA, é muito importante a presença de um macho adulto alocado na frente da fêmea, estimulando-a através dos estímulos tácteis, auditivo, visual e dos ferormônios durante todo o tempo de inseminação [38]. O procedimento seqüencial inicia com a limpeza a seco da vulva e introdução da pipeta de inseminação, previamente umedecida com algumas gotas da dose inseminante, no sentido dorso-cranial com um movimento rotatório no sentido anti-horário. Após fixar a pipeta na cérvix, é realizada a infusão da dose inseminante. Esse procedimento deve ter uma duração aproximada de 3 a 5 minutos, sempre com a constante presença do cachaço e estímulo focinho com focinho. Caso exista dificuldade de infusão da dose ou, ocorra refluxo durante a IA, é recomendada uma imediata readaptação da

pipeta de IA. Ao término da infusão de todo o conteúdo da dose inseminante, a pipeta é retirada girando-a no sentido horário. Todo o procedimento é bastante simples, entretanto há a necessidade de um treinamento inicial da equipe de inseminadores para evitar erros básicos no desenvolvimento da técnica.

O número de espermatozóide na dose inseminante é um dos pontos críticos para o sucesso do programa de IA. Trabalhos confirmam que doses inseminantes com menos de 2 bilhões de espermatozóides na IA convencional resultam em redução do desempenho reprodutivo [2,40,42,45]. Por isso, a redução das perdas de espermatozóide torna-se importante durante a realização da IA e principalmente quando é reduzido o número de espermatozóide na dose.

### **1. Otimização do manejo dos machos da CIA**

Uma das principais vantagens da IA é permitir a diminuição da proporção de machos em relação ao plantel de fêmeas atendidas. Enquanto na monta natural são necessários 5% de machos, na IA essa proporção é consideravelmente reduzida para 0,5 a 1% [43]. Porém, existem certos pontos críticos do manejo da central que podem otimizar a utilização dos machos e melhorar ainda mais a produtividade e lucratividade do setor.

Existem procedimentos e ações simples que permitem a melhor utilização da produção dos animais e do laboratório, que por si só já otimizariam a produção. Portanto, antes mesmo de pensar em grandes alterações no modelo de inseminação, podem ser melhorados os resultados apenas realizando o processo da melhor forma possível, sempre objetivando a produção de  $4500 \times 10^9$  espermatozóides/macho/ano, ou seja, 1500 doses de 3 bilhões [9].

O fornecimento de condições ambientais adequadas para a plena produção espermática utilizando sistemas de ambiente controlado ou ventilação e aspersão, investimentos em instalações de maior qualidade de piso em baias ou gaiolas, enfim investimentos em bem-estar animal que possam refletir na produção espermática adquiriram importância nos últimos tempos, à medida que a influência dessa condição sobre a produtividade passou a ser mais evidenciada em trabalhos de pesquisa na área [51].

A utilização de fichários ou “softwares” para o controle individual das coletas, além de facilitar a organização das atividades, permite uma visualização individual da qualidade da produção de cada animal,

facilitando a identificação de animais problema e sua adequada remoção do plantel. Essas formas de controle, porém, nem sempre funcionam adequadamente e as informações ali registradas nem sempre são fidedignas [9].

A correta utilização dos machos do plantel compreende a realização do número de coletas semanais adequado à idade dos animais. É recomendada a coleta de machos com idade entre 7- 12 meses uma vez por semana, 12-15 meses 3 vezes em 2 semanas e, a partir dessa idade, altera-se o protocolo para duas vezes por semana [52]. O número médio de saltos por semana depende também do sistema de desmama adotado pelas unidades que receberão o sêmen (diário, semanal, concentrado em alguns dias da semana) o que determina ou não a existência de picos de produção de dose inseminante.

Outro ponto fundamental para a produtividade é a organização das práticas de reposição e dos descartes de forma planejada, para que não existam contratempos que alterem a idade média do plantel, prejudicando assim a produção espermática e o uso das instalações.

O adequado treinamento da equipe da CIA também influencia na produtividade do setor, inicialmente pela adequada coleta do sêmen, evitando perdas de parte do ejaculado e o desperdício dos espermatozóides, e posteriormente na decisão de descartar adequadamente os ejaculados impróprios para diluição, durante a avaliação dentro do laboratório. Wollmann [51] encontrou diferenças significativas em todos os parâmetros quantitativos estudados do ejaculado em relação ao coletador (Tabela 3).

O método utilizado para determinação da concentração espermática é outro ponto de controle fundamental para diminuir o desperdício de células. Os métodos empíricos de determinação de concentração, como a avaliação pelo aspecto do ejaculado, são extremamente imprecisos e improdutivos, já que tanto a sub quanto a superestimação são indesejáveis. Os equipamentos para essa avaliação estão disponíveis no mercado sob a forma de câmaras hemo-citométricas, espermodensímetros e fotômetros, sendo sua recomendação realizada de acordo com o tamanho da CIA [44].

O que pode facilmente ser afirmado é que a maioria das CIAs poderia apresentar resultados melhores de produtividade sem maiores investimentos, apenas otimizando a utilização do plantel e melhorando a administração dos recursos existentes.

**Tabela 3.** Número de espermatozoides por coleta, volume seminal (VOL) e concentração espermática (sptz/mL) de acordo com os coletadores.

COLETADOR	n	Nº sptz (x10 <sup>9</sup> )	CONC (x10 <sup>6</sup> )	n	VOL (mL)
A	979	86,1±0,9 b	328,5±3,2 b	983	272,6±3,0 b
B	910	92,3±0,9 a	333,5±3,3 b	912	287,5±3,1 a
C	772	90,1±1,0 a	344,1±3,5 a	775	275,1±3,3 a

Wollmann *et al.* [52] (LSmeans ± EP) a, b na mesma coluna P<0,05

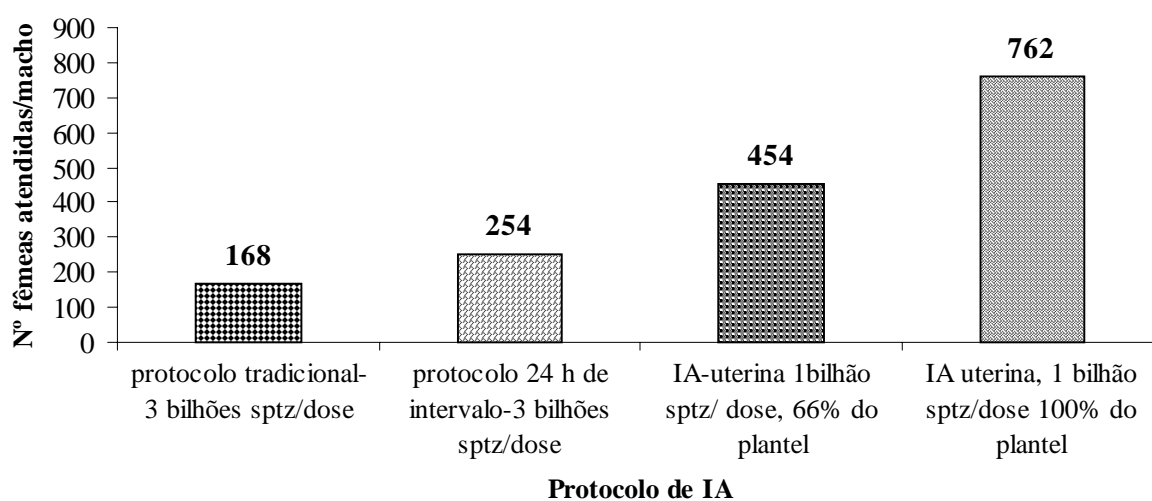
## 2. Inseminação intra-uterina

Nos últimos anos, foi proposta uma alteração na técnica de IA preconizando a deposição do sêmen intra-uterinamente [27,42]. A técnica consiste no emprego de um cateter que desliza pelo interior da pipeta tradicional, passa pela cérvix e é introduzido até 20 a 25 cm no corpo ou corno uterino. Essa tecnologia permite o emprego de uma dose com 1 bilhão de espermatozoides em um volume total de 50-60mL, 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 [42]. Com isso, há uma possibilidade de potencializar o uso de machos geneticamente superiores, incrementando o ganho genético do rebanho. A Figura 3 ilustra o número de fêmeas que podem ser atendidas por macho do plantel utilizando diferentes protocolos e tipos de inseminação. Para efeito de cálculo, nessa simulação, a inseminação intra-uterina é utilizada em 66% do plantel devido à impossibilidade de inseminar com essa técnica

leitoas e primíparas (aproximadamente 34% do plantel de fêmeas). Essas categorias são inseminadas no protocolo de 24 horas de intervalo. A última barra do gráfico simula a possibilidade de inseminação de 100% do plantel intra-uterinamente com doses de 1 bilhão de espermatozoides.

A técnica exige um treinamento básico da equipe, porém é de fácil execução. Na IA uterina, o operador demora um pouco mais para alocar a pipeta no local de deposição, em compensação, como o volume da dose é menor, o tempo de infusão é reduzido. Assim sendo, quando comparado à técnica tradicional, o tempo gasto para realizar todo o procedimento de IA é praticamente o mesmo [42].

Essa nova tecnologia tem algumas limitações: necessidade de treinamento e supervisão periódica de forma mais intensiva que a tradicional, aumento dos gastos no procedimento devido ao cateter adicional, necessidade de empregar uma tecnologia de alta precisão na contagem do número de espermatozoides por

**Figura 3.** Cálculo do número de fêmeas atendidas por macho do plantel de acordo com o protocolo de IA utilizado.

Protocolo tradicional: IA 12, 24, 36 e 60 horas após o início do estro; protocolo 24h: IA 12, 36 e 60 horas após o início do estro; O número de IAs é determinado pela duração do estro da fêmea. Bortolozzo *et al.*[9]



dose, dificuldade de inseminar leitoas e algumas primíparas, devido à dificuldade de passagem do cateter através da cérvix desses animais mais jovens.

Sob o ponto de vista técnico, Watson e Behan [42], empregando as duas técnicas com 3 diferentes números de espermatozoides por dose (1, 2 e 3 bilhões), demonstrou que é possível alcançar resultados semelhantes, empregando 1 bilhão de espermatozoides por dose na IA uterina, em comparação a 2 e 3 bilhões na IA tradicional (Tabela 4).

Acredita-se que treinamento da equipe de inseminação para utilização do novo instrumento não será um fator a dificultar a aplicabilidade da nova técnica. Um certo grau de dificuldade na passagem do cateter através da cérvix pode ser encontrado, porém, na maioria dos animais, a passagem ocorre com nenhuma ou pouca dificuldade (Tabela 5).

### 3. Minimização das perdas de espermatozoide durante e após a IA

A diminuição do volume e do número de espermatozoide no trato genital feminino ocorre rapidamente nas primeiras horas após a IA. Esse mecanismo é, em parte, um processo de defesa do organismo da fêmea em relação ao material estranho depositado no útero.

Os espermatozoides que não alcançam o reservatório espermático são eliminados basicamente de

duas formas: fagocitose e refluxo. Essas perdas de sêmen durante e após a IA, podem diminuir o número de células que alcançam o local da fecundação [39].

#### 3.1 Perdas por refluxo

No suíno, o grande volume de sêmen depositado, independente da forma de cobertura utilizada, provavelmente torne o refluxo um fenômeno fisiológico e, tanto durante a monta natural (150-500mL) quanto durante a IA (90-100 mL), a presença de refluxo de parte do ejaculado é registrada. Porém, apesar de ser tratado como um fenômeno natural, a importância de perdas de células espermáticas é mais expressiva à medida que se reduz o número de espermatozoides infundidos por dose inseminante. A Tabela 6 contém os resultados de três trabalhos que quantificaram o volume e número de espermatozoide no refluxo durante e até duas horas após a IA. Os valores estão expressos em percentual do total infundido.

A redução de perdas de espermatozoides pelo refluxo não é facilmente atingida, já que existe uma variação individual muito grande entre fêmeas e até mesmo entre inseminações em uma mesma fêmea. As causas dessa variabilidade ainda são pouco estudadas. Segundo Levis *et al.* [26], o refluxo também pode ser o resultado de erros na técnica de IA e da falta de paciência e habilidade do inseminador, dependendo também da qualidade da mão-de-obra.

**Tabela 4.** Desempenho reprodutivo de matrizes submetidas a IA uterina ou tradicional com 1, 2 e 3 bilhões de espermatozoides por dose.

	IA Tradicional			IA Uterina		
	1	2	3	1	2	3
Número de spz/dose (x10 <sup>9</sup> )						
Taxa Parto (%)	65.8 a	91.8 b	91.1 b	86.9 b	92.5 b	90.5 b
Leitões Nascidos Totais	10.3 a	12.6 b	12.5 b	12.1 b	12.3 b	12.3 b

a, b na mesma linha, P<0,05. Watson e Behan [42]

**Tabela 5.** Possibilidade de passagem de diferentes tipos de instrumentos através da cérvix da fêmea suína.

Autores	OP	Instrumento	Sucesso na passagem do cateter (cérvix)
Watson e Behan [42]	2-11	Pipeta com cateter	95%
Martinez <i>et al.</i> [28]	2-6	Cateter flexível	95,4%
Dallanora* [12]	2-4	Pipeta com cateter	97,4%

\*dados não publicados.

### 3.2 Perdas por fagocitose

O influxo de polimorfonucleares (PMNs) ao ambiente uterino é desencadeado pela deposição do sêmen, já que, durante a fase luteal, a contagem dessas células no trato genital feminino é praticamente nula. A fagocitose das células espermáticas é a principal forma de eliminação de espermatozóide do trato genital feminino [30,34,36] e esse processo de limpeza é fisiológico e necessário. Basicamente tem a função de preparar o útero para receber os embriões.

Vários estudos apresentaram a hipótese de que os espermatozoides velhos, mortos ou prematuramente capacitados seriam os primeiros a serem fagocitados [11,13]. Entretanto, recentes estudos de fagocitose *in vitro* têm mostrado que os espermatozoides intactos e móveis são mais rapidamente fagocitados que os mortos ou danificados [31]. *In vitro*, a fagocitose foi substancialmente reduzida nas células que sofreram tratamento para capacitação (Figura 4). O processo de capacitação parece diminuir os receptores para PMNs na superfície dos espermatozoides, diminuindo assim a destruição dessas células.

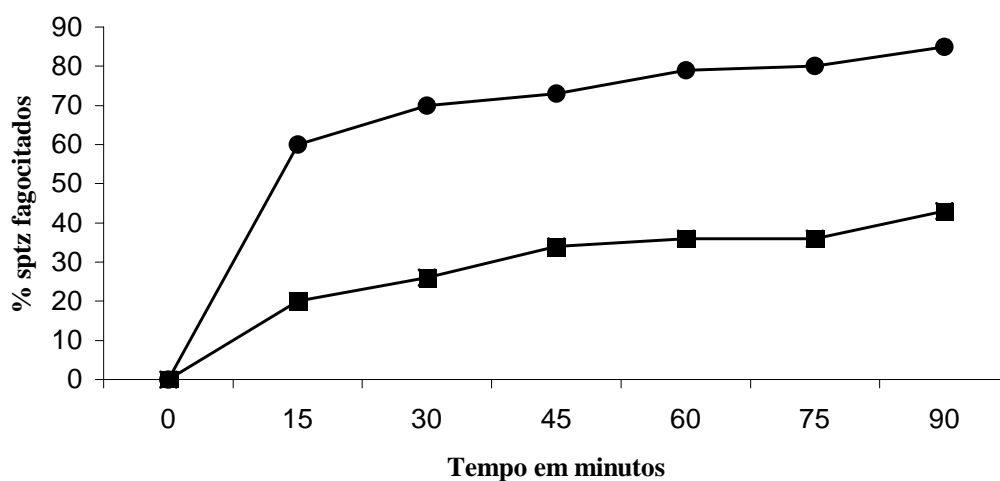
Através de coleta de refluxo com bolsas de colostomia e da lavagem do trato genital feminino após o abate dos animais 4 horas após a IA, Matthijs *et al.* [30] encontraram um número total de PMNs nove vezes maior ( $P < 0,01$ ) nas fêmeas inseminadas quando comparado com fêmeas em estro não inseminadas.

A redução da fagocitose através da adição de Cálcio e cafeína no período de inseminação foi testada recentemente por Woelders *et al.* [49] e apresentou resultados significativos na ação dos PMNs sobre as células espermáticas. O autor cita que o mecanismo pelo qual ambos atuam é basicamente a alteração dos mecanismos de ingestão e aderência de partículas pelas células fagocitárias e a diminuição da fagocitose espermática. Dois experimentos foram conduzidos para avaliar a fagocitose e os efeitos sobre os embriões e os resultados estão apresentados nas Tabelas 7 e 8. As fêmeas foram inseminadas com 1 bilhão de espermatozoides diluídos em BTS e BTS com  $\text{CaCl}_2$  e cafeína e foram abatidas 4 horas após a IA, sendo coletado o refluxo durante a IA e os espermatozoides no trato genital feminino após o abate (Tabela 7). O grupo tratado com  $\text{CaCl}_2$  e cafeína teve um menor número de PMN no refluxo e no

**Tabela 6.** Porcentual de volume e de espermatozoides presentes no refluxo vaginal durante e após a IA em suínos.

Autores	% do volume	% de espermatozóide
Steверink <i>et al.</i> [40]	70 (17-120)	25 (3-48)
Flores [17]	68,7 (0-118)	30 (0-105)
Dallanora* [12]	62,7 (0-111)	23 (0-62)

\* Dados não publicados.



**Figura 4.** Efeito da capacitação *in vitro* sobre a fagocitose de espermatozoides de suínos pelos PMN-leucócitos *in vitro*. ● sêmen não tratado; ■ sêmen com tratamento para capacitação; Matthijs *et al.* [31].

trato genital e um maior número de espermatozoides presentes no trato genital. Posteriormente, foi avaliado o efeito da adição dos mesmos cátions ao BTS sobre o número de embriões viáveis e espermatozóide acessórios após a inseminação das fêmeas com 0,5 bilhão de espermatozóide aproximadamente 26 horas antes trole quando a IA ocorreu mais distante da ovulação ( $\pm 26$  h), apresentando um número maior de espermatozoides acessórios, sendo indicativo de que um maior número dessas células alcançou o local da fecundação. Não existiram diferenças no número de embriões normais produzidos.

Porém, essa ação sobre as defesas do trato genital feminino pode promover maior susceptibilidade às infecções e, provavelmente, a qualidade da dose inseminante, sob o aspecto de contaminação bacteriana, passa a ter maior importância. Outro ponto importante a ser estudado é a toxicidade desses produtos sobre a célula espermática.

#### V. ANÁLISE E DILUIÇÃO DE SÊMEN PARA PRODUÇÃO DE DOSES COM REDUZIDO NÚMERO DE ESPERMATOZÓIDE

Os métodos tradicionalmente utilizados para produção de doses de 3 bilhões de espermatozóide necessitarão de maior precisão, principalmente no que diz respeito a determinação da concentração espermática e de

diluição e envase adequados para que exista uma padronização do número de espermatozóide por dose, pois a importância da presença de falhas no processo é proporcionalmente maior à medida que é reduzido o número de células por dose [9].

Com a redução do número de espermatozóide por dose inseminante para  $1 \times 10^9$ , tornar-se-á possível a produção de 2 a 3 vezes mais doses por ejaculado. Isso implica numa redução da necessidade de machos no plantel. Porém a redução não ocorre na mesma proporção que a redução do número de espermatozoides, devido à necessidade de manter animais de reserva para serem utilizados quando do descarte de ejaculados, alterações de saúde e morte, ou até acidentes que promovam o descarte imediato do reprodutor [9]. Com isso, a otimização da utilização dos machos passa a ser mais evidente nas CIAs de maior porte.

A diluição de pequenos volumes implica em cuidados redobrados com a temperatura de todos os materiais que entram em contato com o sêmen, temperatura de diluição e qualidade e procedência do diluidor e da água. A qualidade da água utilizada no processamento das doses tem importância indiscutível independente da tecnologia utilizada e do número de espermatozóide por dose [7].

A redução no número de espermatozóide por dose inseminante aumenta a importância das análises

**Tabela 7.** Resultados do recrutamento de polimorfos nucleares (PMN) ao trato genital feminino (TGF) após a IA com sêmen diluído em BTS e BTS adicionado de  $\text{CaCl}_2$  e cafeína.

	n	Espermatozoides x $10^6$				PMNx $10^6$ TGF + refluxo
		Refluxo	TGF	Útero	Ovidutos	
Controle	6	495 $\pm$ 75	58 $\pm$ 14	13 $\pm$ 1,1	0,08 $\pm$ 0,03	4458 $\pm$ 1029
$\text{CaCl}_2$	5	313 $\pm$ 92	216 $\pm$ 72	162 $\pm$ 77	0,04 $\pm$ 0,01	1327 $\pm$ 593

Woelders *et al.* [49].

**Tabela 8.** Efeito da utilização de BTS e de BTS adicionado de  $\text{CaCl}_2$  e cafeína na porcentagem de embriões normais e número de espermatozóide acessórios em fêmeas inseminadas com 0,5 bilhão de espermatozoides.

	IA $\pm 26$ h antes da ovulação		IA $\pm 4$ h após da ovulação	
	Controle (16)	$\text{CaCl}_2$ (16)	Controle (16)	$\text{CaCl}_2$ (17)
% embriões normais	89,9%	96,4%	98,5%	100,0%
Espermatozoides acessórios	5,8 a	16,2 bc	44,6 c	41,9 c

a, b na mesma linha  $P < 0,001$ ; para % de embriões totais não houve diferença estatística significativa. Woelders *et al.* [49].

de rotina no laboratório da CIA, após a coleta do ejaculado e com a adoção dessa nova tecnologia, existirá uma redução do trabalho no setor de coletas e um aumento nas atividades do laboratório da CIA. A redução do número de coletas por dia permite que seja dada uma maior atenção aos ejaculados dentro do laboratório. Maior tempo pode ser gasto para as avaliações, resultando na maior confiabilidade das análises, o que é extremamente desejável.

O exame de morfologia espermática é realizado rotineiramente em intervalos de 30-45 dias na rotina da maioria das CIAs [21]. A drástica redução no número de espermatozóide justifica a realização do exame com maior frequência, para que não existam riscos de que alterações na morfologia espermática passem despercebidas em alguma das coletas e prejudiquem a qualidade da dose inseminante.

A necessidade de extrema precisão na avaliação da concentração espermática exige a utilização de métodos diretos de determinação, devido à maior confiabilidade. Uma das opções é a contagem na câmara hemocitométrica [21]. A utilização desse método de contagem exige treinamento dos funcionários responsáveis, já que são necessários alguns cuidados na realização da coleta da amostra, diluição desta, montagem da câmara e ajuste do microscópico. Para que a contagem possua confiabilidade, o treinamento dos funcionários da CIA torna-se imprescindível [43].

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

A inseminação com pequenos volumes e reduzido número de espermatozoides por dose interfere também no aspecto de embalagem e conservação do sêmen. Em casos de volumes de 60 mL, esse problema não chega a existir, devido a possibilidade de utilização dos mesmos materiais utilizados na IA tradicional, porém, quando são usados volumes como 5-10 mL, provavelmente seja criado um novo problema que precisa ser solucionado. Nos trabalhos que utilizaram volumes baixos semelhantes a 5-10 mL [27,50], o procedimento de infusão da dose foi realizado com o auxílio de seringas. Existe a possibilidade de armazenamento das doses em recipientes contendo o volume e número de

espermatozoides totais para produzir determinado número de dose inseminante, já diluídos na concentração desejada, sendo retiradas as doses com volumes pequenos somente no momento da IA.

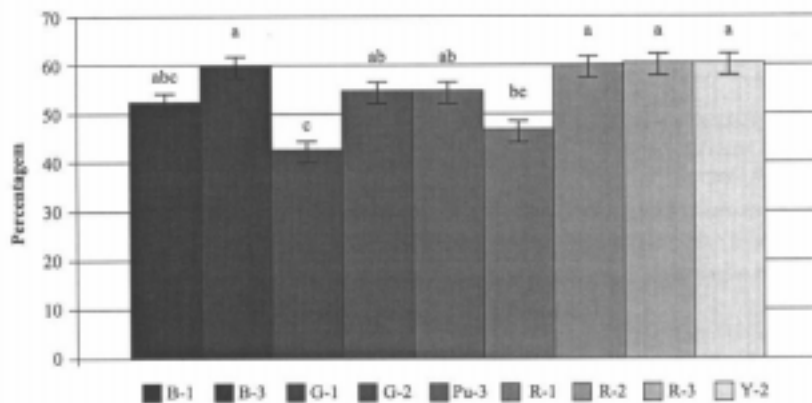
A avaliação da motilidade durante 96-120 horas após a coleta parece ser importante, já que as diluições são extremamente altas e a presença de plasma seminal é praticamente nula. Segundo Foxcroft *et al.* [19], a avaliação da motilidade após a diluição por períodos prolongados até 240 horas pode ser uma forma de identificar animais superiores em termos de fertilidade. As figuras 5, 6 e 7 mostram que os animais que tiveram menores índices de motilidade ao décimo dia, também tiveram os menores resultados de taxa de prenhez, de parição e de tamanho de leitegada.

## VI. CONCLUSÕES

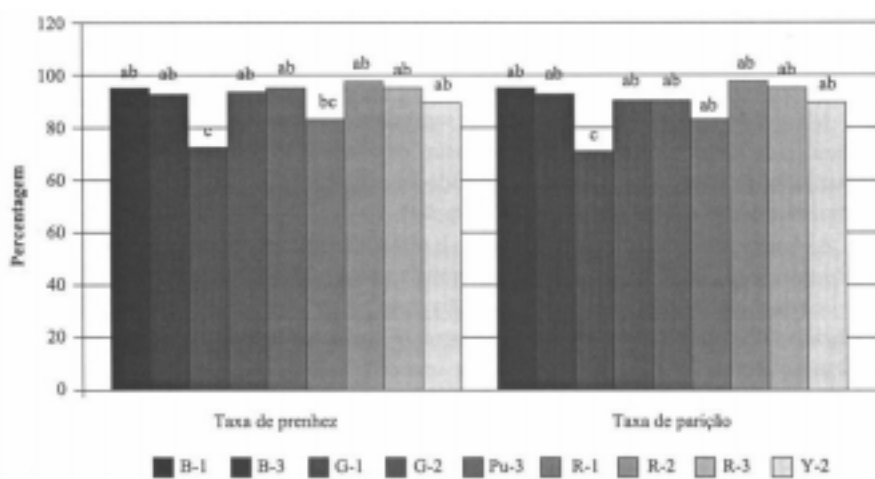
A IA na espécie suína é uma biotecnologia que se estabeleceu em definitivo na rotina de manejo das unidades de produção a nível mundial. Com isso, no agronegócio ela já representa 60-70% dos negócios realizados no setor. Paralelo a isso, observa-se que há uma evolução tecnológica constante nos manejos e técnicas empregadas, porém é fundamental para a lucratividade e produtividade do setor que as práticas básicas sejam realizadas o mais corretamente possível, otimizando assim os resultados com a estrutura já instalada, sem maiores investimentos.

A pesquisa nessa área, nos últimos anos, tem buscado basicamente atingir dois objetivos: redução dos custos de cobertura e potencialização do emprego de machos geneticamente superiores. Chamam a atenção os trabalhos que desenvolveram protocolos de IA adaptados às técnicas de manejo utilizados na exploração suinícola e as pesquisas que visam a redução do número de espermatozoides necessários/fêmea/ano.

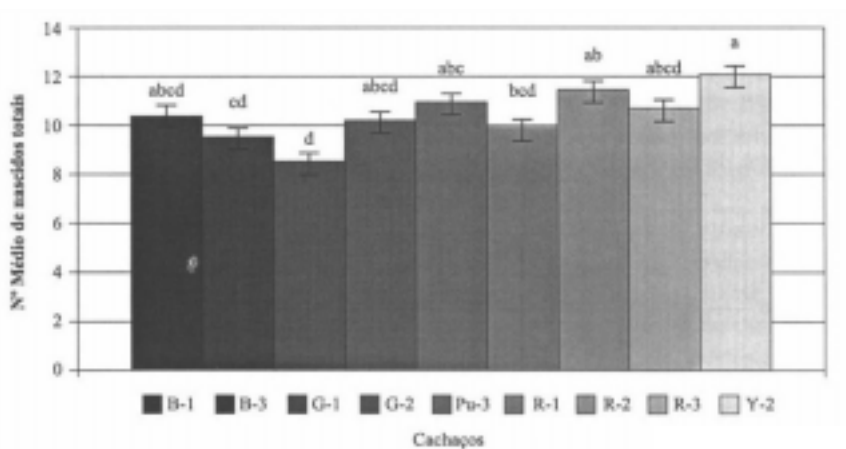
Utilizando protocolos e técnicas novos ou tradicionais, fica explícita a importância no treinamento, reciclagem e fiscalização periódica dos procedimentos que vêm sendo realizados na rotina das unidades de produção. Cabe salientar que, ao aplicar essas novas tecnologias, não se deve esquecer dos procedimentos básicos relacionados ao diagnóstico de estro, a qualidade da dose inseminante empregada e a qualificação profissional do ser humano que desenvolve todos os procedimentos.



**Figura 5.** Motilidade ao décimo dia do sêmen diluído de nove cachações utilizado para inseminar leitões com doses de 1,5 bilhão de espermatozoides ( $P < 0,05$ ). Foxcroft [19].



**Figura 6.** Média para taxa de prenhez e taxa de parição de leitões inseminadas com doses de 1,5 bilhão de sptz ( $n = 9$  animais, realização de, pelo menos, 50 coberturas por macho).  $P < 0,05$ . Foxcroft [19].



**Figura 7.** Tamanho médio da leitegada de leitões inseminadas com doses de 1,5 bilhão de espermatozoides de acordo com o macho utilizado. Foxcroft [19].

#### REFERÊNCIAS

- 1 **ABIPECS/ABCS. 2001.** Disponível em: <www.porkworld.com.br>. Acessado em 11/2002.
- 2 **Baker R.D., Dziuk P.J. & Norton H. W. 1968.** Effect of volume of semen, number of sperm and drugs on transport of sperm in artificially inseminated gilts. *Journal of Animal Science*. 27: 88-93.
- 3 **Bennemann P.E. 1998.** Avaliação de doses inseminantes produzidas em centrais de inseminação artificial de suínos no sul do Brasil e o efeito da contaminação bacteriana sobre a qualidade espermática. 254f. Porto Alegre, RS. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- 4 **Bernardi M. & Ohata P. 2000.** Situação atual e perspectivas do emprego de sêmen congelado na inseminação artificial em suínos. In: *Anais do III Simpósio Internacional de Inseminação Artificial em Suínos* (Flores da Cunha, Brasil). pp.120-131.
- 5 **Borchardt Neto G. 1998.** Causes of variation of oestrus length and onset of oestrus-ovulation interval and their relationship with pregnancy rate and litter size in multiparous sows. 91p. Hannover. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Institut für Reproduktionsmedizin der Tierärztliche Hochschule Hannover.
- 6 **Bortolozzo F. P., Uemoto D. A., Wentz I. & Pozzobon M.C. 1999.** Reproductive performance of gilts submitted to artificial insemination in different intervals before ovulation. In: *Proceedings of IV International Conference on Boar Semen Preservation* (Maryland, USA). p.38.
- 7 **Bortolozzo F.P. & Wentz I. 1995.** Incremento da eficiência reprodutiva em programa de inseminação artificial (IA) no suíno. In: *Anais do 11º Congresso Brasileiro de Reprodução Animal* (Belo Horizonte, Brasil). pp.131-141.
- 8 **Bortolozzo F.P. & Wentz I. 2000.** Momento e frequência ideal para realizar a inseminação artificial em suínos. In: *Anais do III Simpósio Internacional de Inseminação Artificial em Suínos* (Flores da Cunha, Brasil). pp.73-78.
- 9 **Bortolozzo F.P., Wentz I. & Dallanora D. 2002.** Avanços na inseminação artificial de suínos. In: *Anais dos Encontros Técnicos ABRAVES-RS* (Estrela, Brasil). pp.1-20.
- 10 **Castagna C.D. 2002.** Considerações sobre programas de inseminação artificial e cistos ovarianos em suínos. 142f. Porto Alegre, RS. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- 11 **Cohen J. & Tyler K.R. 1980.** Sperm populations in the female genital tract of the rabbit. *Journal of Reproduction and Fertility*. 60: 213-218.
- 12 **Dallanora D., Mezalira A., Katzer L.H., Bernardi M.L., Bortolozzo F.P. & Wentz I. 2004.** Volume and sperm number in the semen backflow after intrauterine or cervical insemination in sows. In: *15th International Congress on Animal Reproduction* (Porto Seguro, Brasil). p.387.
- 13 **D’Cruz O.J. & Haas Jr. G.G. 1995.** b<sub>2</sub> Integrin (CD11b- CD18) is the primary adhesive glycoprotein complex involved in neutrophil-mediated immune injury to human sperm. *Biology of Reproduction*. 53: 1118-1130.
- 14 **Dias C. P., Marchetti A. N., Pozzobon M. C., Bortolozzo F.P., Wentz I. & Borchardt Neto G. 1999.** Desempenho reprodutivo de fêmeas suínas inseminadas no metaestro. In: *Anais do 9º Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos* (Belo Horizonte, Brasil). p.357.
- 15 **Eriksson B., Jounala T., Andersson M. & Rodriguez-Martinez H. 1998.** Viability of frozen-thawed boar semen. In: *Proceedings of International Congress on Animal Reproduction* (Stockholm, Sweden). p.526.
- 16 **Eriksson B.M. & Rodriguez-Martinez H. 1999.** Export of frozen boar semen in a new flat package. In: *Proceedings of the IV International Conference on Boar Semen Preservation* (Beltsville, U.S.A.). p.26.
- 17 **Flores L.A.S. 2001.** Comparação entre os diferentes métodos “auto-IA”, intermediário e tradicional de inseminação artificial em suínos. 61f. Porto Alegre, RS. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- 18 **Flowers W.L. & Esbenshade K.L. 1993.** Optimizing management of natural and artificial mating in swine. *Journal of Reproduction and Fertility* (Suppl 48): 217-228.
- 19 **Foxcroft G.R. 2002.** Melhorando os resultados da inseminação artificial e monta natural. In: *Anais do Congresso Latino Americano de Suinocultura* (Foz do Iguaçu, Brasil). pp.25-37.
- 20 **Gil J., Jimenez M., Diaz C., Sanchez R. & Martin Rillo S. 1996.** Swine Ai with frozen boar semen in work routine. *Reproduction in Domestic Animals*. 31: 289-290.
- 21 **Glossop C. 1996.** Semen collection, evaluation and handling. In: *Proceedings of Swine Reproduction Symposium* (Washington, USA). pp.7-14.

- 22 Heck A. 1999. Caracterização do momento da ovulação e da duração do estro em um rebanho suíno. 107f. Porto Alegre, RS. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- 23 Hofmo P.O. & Almlid T. 1991. Recent developments in freezing of boar semen with special emphasis on cryoprotectants. *Reproduction in Domestic Animals*. 1: 111-122.
- 24 Johnson L.A. 1998. Current developments in swine semen: preservation, artificial insemination and sperm sexing. In: *Proceedings of 15th IPVS Congress* (Birmingham, England). pp.225-229.
- 25 Kemp B. & Soede N. M. 1996. Relationship of weaning-to-estrus interval to timing of ovulation and fertilization in sows. *Journal of Animal Science*. 74: 944-949.
- 26 Levis D.G., Burroughs S. & Willians S. 2002. Use of intrauterine insemination of pigs: pros, cons e economics. Ohio Pork Industry Center. The Ohio University extension. Disponível em: <www.porkinfo.osu.edu/Word%20Documents/AIntrauterineDL.doc>. Acessado em: 09/2002.
- 27 Martinez E.A., Vazquez J.M., Roca J., Lucas X., Gil M.A., Parrilla J.L., Vazquez J.L. & Day B.N. 2002. Minimum number of spermatozoa required for normal fertility after intrauterine insemination in non-sedated sows. *Reproduction*. 123: 163-170.
- 28 Martinez E.A., Vazquez J.M., Roca J., Lucas X., Gil M.A. & Vazquez J.L. 2001. Deep Intrauterine Insemination and Embryo Transfer. In: *Proceedings of 6th International Conference on Pig Reproduction* (Missouri, USA). p.129.
- 29 Martini R. L. 1998. Desempenho reprodutivo de leitoas submetidas à infusão uterina de plasma seminal no momento da detecção do estro da cobertura. 111f. Porto Alegre, RS. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- 30 Matthijsa A., Hakze R., Potsma A. & Woelders H. 2000. Leukocyte recruitment and phagocytosis of boar spermatozoa. In: Johnson L.A. & Guthrie H.D. (Eds). *Boar Semen Preservation IV*. Lawrence: Allen Press, pp.35-41.
- 31 Matthijsa A., Harkema W., Engel B. & Woelders H. 2000. *In vitro* phagocytosis of boar spermatozoa by neutrophils from peripheral blood of sows. *Journal of Reproduction and Fertility*. 120: 265-273.
- 32 Mileham A.J., Haven D., Rohl J. & Van der Steen H.A.M. 1997. Porcine semen cryopreservation in a commercial setting. In: *Proceedings of the V International Conference on Pig Reproduction*. (Kerkrade, Netherlands). p.128.
- 33 Nissen A.K., Soede N.M., Hyttel P., Schmidt M. & D'Hoore L. 1997. The influence of time of insemination relative to time of ovulation on farrowing frequency and litter size in sows, as investigated by ultrasonography. *Theriogenology*. 47: 1571-1582.
- 34 Pursel V.G., Schulman L.L. & Johnson L.A. 1978. Distribution and morphology of fresh and frozen-thawed sperm in the reproductive tract of gilts after artificial insemination. *Biology of Reproduction*. 19: 69-76.
- 35 Rojkittihum T., Sterning M., Rydhmer L. & Einarsson S. 1992. Oestrous symptoms and plasma levels of oestradiol-17b in relation to the interval from weaning to oestrus in primiparous sows. In: *Proceedings of 12th IPVS Congress*. v.1.(Hague, Netherlands). p.485.
- 36 Rozeboom K.J., Troedson M.H. & Crabo B.G. 1998. Characterization of uterine leukocyte infiltration in gilts after artificial insemination. *Journal of Reproduction and Fertility*. 114: 195-199.
- 37 Soede N.M., Wetzels C.C.H. & Kemp B. 1995. Oestrus (standing response for boar and man) and ovulation in sows. In: *Proceedings of III International Conference on Boar Semen Preservation* (Mariensee, Germany). pp.170-171.
- 38 Soede N. M., Wetzels C.C.H., Zondag W. & Kemp B. 1995. Effects of time of insemination relative to ovulation, as determined by ultrasonography, on fertilization rate and accessory sperm count in sows. *Journal of Reproduction and Fertility*. 104: 99-106.
- 39 Steverink D.W., Soede N.M., Bouwman E.G. & Kemp B. 1998. Semen backflow after insemination and its effect on fertilization results in sows. *Animal Reproduction Science*. 54: 109-119.
- 40 Steverink D.W., Soede N.M., Bouwman E.G. & Kemp B. 1997. Influence of insemination-ovulation interval and sperm cell dose on fertilization in sows. *Journal of Reproduction and Fertility*. 111: 165-171.
- 41 Uemoto D.A. 1999. Comportamento estral e desempenho reprodutivo de leitoas submetidas à inseminação artificial em diferentes intervalos pré-ovulatórios. 96f. Porto Alegre-RS. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- 42 Watson P.F. & Behan J.R. 2002. Intrauterine insemination of sows with reduced sperm numbers: results of a commercially based field trial. *Theriogenology*. 57: 1683-1693.

- 43 **Wentz I. & Bortolozzo F.P. 1998.** Inseminação Artificial em Suínos. In: Sobestianski J., Wentz I., Silveira P.R.S. & Sesti L.A.C. (Eds). *Suinocultura Intensiva*. Brasília: Embrapa, pp.211-220.
- 44 **Wentz I., Vargas A J., Bortolozzo F.P. & Castagna C.D. 2000.** Situação atual da inseminação artificial em suínos no Brasil e viabilização econômica do emprego dessa biotécnica. In: *Anais do III Simpósio Internacional de Inseminação Artificial em Suínos* (Flores da Cunha, Brasil). pp.5-12.
- 45 **Weitze K.F. 1991.** Long-term storage of extended boar semen. *Reproduction in Domestic Animals*. 26 (Suppl 1): 231-253.
- 46 **Weitze K. F., Wagner-Rietschel H., Waberski D., Richter L. & Krieter J. 1994.** The onset of heat after weaning, heat duration, and ovulation as major factors in AI timing in sows. *Reproduction in Domestic Animals*. 29: 433-443.
- 47 **Westendorf P., Richter L. & Treu H. 1975.** Zur Tiefgefrierung von Ebersperma: Labor- und Besamungs- ergebnisse mit dem Hülsenberger Pailletten-Verfahren. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*. 82: 261-267.
- 48 **Woelders H. 1997.** Fundamentals and recent development in cryopreservation of bull and boar semen. *Veterinary Quartely*. 19: 135-138.
- 49 **Woelders H., Matthijs J.J., Bowmann E.G. & Soede N.M. 2000.** Caffeine plus Ca<sup>2+</sup> reduces uterine leukocyte recruitment and sperm phagocytosis and improves fertility in pig AI. In: *Proceedings of 14th International Congress on Animal Reproduction* (Stockholm, Sweden). pp.2-6.
- 50 **Wolken A., Rath D., Bortolozzo F.P., Wentz I. & Marquetti A. 2002.** Sows can successfully be inseminated non-surgically into the distal uterine horn with a highly reduced number of sperm cells. In: *Proceedings of the 28th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society* (Foz do Iguaçu, Brazil). *Theriogenology*. 57: 392.
- 51 **Wollmann E.B. 2002.** Variação os parâmetros seminais em suínos destinados à inseminação artificial de acordo com a idade, época do ano, alojamento e coletador. 68f. Porto Alegre, RS. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- 52 **Wollmann E.B., Bortolozzo F.P., Wentz I., Bennemann P.E., Borchardt Neto G., Ferreira F.M. & Peruzzo I. 2002.** Differences in sperm output according to boar age in an AI centre. In: *Proceedings of the 17th IPVS Congress* (Iowa, USA). p.488.