UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

EFEITO DE DILUENTES NA QUALIDADE DE SÊMEN SUÍNO ARMAZENADO A 17ºC E NO DESEMPENHO REPRODUTIVO DAS FÊMEAS APÓS INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

GIANCARLO COSTI

PORTO ALEGRE
2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

EFEITO DE DILUENTES NA QUALIDADE DE SÊMEN SUÍNO ARMAZENADO A 17ºC E NO DESEMPENHO REPRODUTIVO DAS FÊMEAS APÓS INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

GIANCARLO COSTI[1]

Dissertação apresentada como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias na área de Reprodução Animal

Orientador: Prof. Dr. Ivo Wentz

PORTO ALEGRE
2003

[1] Médico Veterinário

C837e Costi, Giancarlo

Efeito de diluentes na qualidade de sêmen suíno armazenado a 17ºC e no desempenho reprodutivo das fêmeas após inseminação artificial /Giancarlo Costi – Porto Alegre: UFRGS, 2003.

54f.; il. – Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, RS-BR, 2003. Ivo Wentz, Orient.

1. Reprodução Animal: suínos 2. Inseminação Artificial 3. Sêmen: motilidade e integridade de membrana 4. Diluentes 5. Desempenho reprodutivo I. Wentz, Ivo, Orient. II. Título.

CDD 619.3856

Catalogação na fonte
Preparada pela Biblioteca da Faculdade de Veterinária da UFRGS

Giancarlo Costi

EFEITO DE DILUENTES NA QUALIDADE DE SÊMEN SUÍNO ARMAZENADO A 17ºC E NO DESEMPENHO REPRODUTIVO DAS FÊMEAS APÓS INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

Aprovada em 23 JUL 2003.

APROVADO POR:

_____

Prof. Dr. IVO WENTZ
Orientador e Presidente da Comissão

_____

Prof. Dr. GUILHERME BORCHARDT NETO
Membro da Comissão

_____

Prof. Dr. ILMO WENTZ
Membro da Comissão

_____

Prof. Dr. RUI FERNANDO FELIX LOPES
Membro da Comissão

DEDICATÓRIA

Dedico o presente trabalho aos meus pais José Carlos e Roseli Terezinha, aos meus irmãos Giovani e Cibele, ao meu sobrinho e afilhado Gabriel e a minha madrinha Marilena (*in memorian*).

AGRADECIMENTOS

À Deus, por permitir que eu tivesse saúde e força para alcançar esse objetivo.

Aos meus pais, José Carlos e Roseli Terezinha, meus irmãos Giovani e Cibele Costi, meu sobrinho e afilhado Gabriel e toda minha família pelo amor, apoio, compreensão e incentivo em todos os momentos da minha formação profissional e pessoal.

Ao tio e padrinho Euclides e aos primos Everton e Fabrício Poleto pelo exemplo de força e coragem para superar os obstáculos imprevistos dessa vida.

À minha "segunda mãe" e dinda Marilena Lavratti Poleto que sempre torceu e com certeza continua torcendo e cantando junto aos anjos. Um exemplo de pureza em pessoa.

Aos tios Jorge e Fátima e ao primo Gustavo Reginato pelos almoços, jantas e ajuda sempre que necessário.

À tia Levi Maria Lavratti Ribeiro pelo carinho, revisão e correção dos trabalhos.

Ao Professor Dr. Ivo Wentz pela orientação, amizade e colaboração para execução deste trabalho.

Ao Professor Dr. Fernando Pandolfo Bortolozzo pela co-orientação, amizade, colaboração e sugestões.

À Professora Dra. Mari Lourdes Bernardi pela amizade, co-orientação, colaboração, correções e sugestões.

Ao Professor Dr. David Emilio dos Santos Neves de Barcellos pelos ensinamentos, amizade e tradução do resumo em inglês.

À Elisane Lenita Milbradt, pelo companheirismo, amizade, empenho e dedicação na execução do experimento.

Aos amigos e colegas do Setor de Suínos da Faculdade de Veterinária da UFRGS, Alisson Mezalira, Anamaria Jung Vargas, Carlos Henrique Peixoto, Cezar Dobler Castagna, Djane Dallanora, Eduardo Ballester Wollmann, Fabiane Pereira Gentilini, Goreti Raninchesky dos Reis, Lia Helena Katzer, Luís Eduardo Razia, Luís

Gustavo Schneider, Paulo Eduardo Bennemann e Vladimir Farias Borges pela amizade e coleguismo durante nossa convivência.

Aos estagiários, bolsistas e futuros colegas do Setor de Suínos da UFRGS pelo carinho, amizade e alegre convivência, em especial à João Batista Richter e Arita Tagliari Postal pelo auxílio na realização desse trabalho.

Aos funcionários da granja e Centro de Difusão Genética da Granja São Roque pela amizade, ajuda e colaboração na realização do experimento.

À Minitub do Brasil pelo fornecimento do material de pesquisa.

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

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS 8
LISTA DE FIGURAS 9
LISTA DE ANEXOS 10
LISTA DE ABREVIATURAS 11
RESUMO 13
ABSTRACT 14
1 INTRODUÇÃO 15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 16
2.1 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL (IA) NA SUINOCULTURA 16
2.2 DILUENTES PARA SÊMEN SUÍNO 17
2.2.1 Histórico 17
2.2.2 Função e composição dos diluentes 18
2.2.2.1 Fonte de energia 19
2.2.2.2 Tampões 19
2.2.2.3 Eletrólitos 19
2.2.2.4 Antimicrobianos 20
2.2.2.5 Estabilizantes de membrana 21
2.3 RESFRIAMENTO E ARMAZENAMENTO DO SÊMEN SUÍNO 22
2.4 QUALIDADE ESPERMÁTICA 23
2.5 FERTILIDADE E DESEMPENHO REPRODUTIVO 25
3 MATERIAL E MÉTODO 29
3.1 EXPERIMENTOS I E II 29
3.1.1 Local e período de execução 29
3.1.2 Procedimentos experimentais gerais 29
3.1.2.1 Coleta do sêmen 29
3.1.2.2 Processamento do ejaculado 29
3.1.2.2.1 Avaliação macroscópica e microscópica do ejaculado 29
3.1.2.2.2 Diluição e envase do sêmen 30
3.1.2.2.3 Resfriamento e armazenamento das amostras de sêmen 30
3.1.2.3 Avaliação da qualidade espermática 31
3.1.2.3.1 Percentual de motilidade (Mot) 31
3.1.2.3.2 Percentual de membranas íntegras (MI) 31
3.1.3 Delineamento experimental 31
3.1.3.1 Experimento I 31
3.1.3.2 Experimento II 32
3.1.4 Análise estatística 33
3.2 EXPERIMENTO III 34
3.2.1 Local e período de execução 34
3.2.2 Animais 34
3.2.3 Procedimentos experimentais 34
3.2.3.1 Seleção e classificação das fêmeas 34

3.2.3.2 Detecção do estro 35
3.2.3.3 Tratamentos 35
3.2.3.4 Processamento das doses inseminantes 35
3.2.3.5 Inseminação artificial (IA) 35
3.2.4 Coleta dos dados de produtividade 36
3.2.5 Delineamento experimental e análise estatística 36
4 RESULTADOS 38
4.1 EXPERIMENTO I 38
4.2 EXPERIMENTO II 39
4.3 EXPERIMENTO III 39
4.3.1 Perfil do rebanho 40
5 DISCUSSÃO 42
5.1 QUALIDADE ESPERMÁTICA *in vitro* 42
5.2 DESEMPENHO REPRODUTIVO 45
6 CONCLUSÕES 47
REFERÊNCIAS 48
ANEXOS 54

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Percentuais de motilidade (Mot), de acrossomas normais (NAR) e de membranas íntegras (MI) de sêmen suíno armazenado em BTS e/ou Androhep® (And), em temperaturas entre 14 e 17°C..... 26

TABELA 2 – Taxa de concepção (TC), taxa de parto (TP), número de leitões nascidos vivos (NV) e número de leitões nascidos totais (NT) após inseminação com sêmen suíno diluído em vários diluentes e armazenado por até 192h em temperaturas entre 15 e 20°C..... 28

TABELA 3 – Categorias utilizadas para a distribuição das fêmeas nos tratamentos..... 35

TABELA 4 – Percentuais de motilidade (média ± desvio-padrão) de sêmen suíno diluído em BTS, Androhep® Enduraguard™ (And End) e Androhep® (And), conforme o momento de avaliação..... 38

TABELA 5 – Percentuais de membranas íntegras (média ± desvio-padrão) de sêmen suíno diluído em BTS, Androhep® Enduraguard™ (And End) e Androhep® (And), conforme o momento de avaliação..... 39

TABELA 6 – Percentuais de motilidade (média ± desvio-padrão) de sêmen suíno diluído em BTS e Androhep® Enduraguard™ (And End) conforme o momento de avaliação..... 39

TABELA 7 – Perfil do rebanho (média ± desvio-padrão) segundo a ordem de parto (OP), a média dos nascidos totais nos partos anteriores (NTPA), o intervalo desmame-estro (IDE) e a duração da lactação (DL) conforme distribuição nos tratamentos..... 40

TABELA 8 – Taxas de retorno ao estro (TRE), de parto (TP) e de parto ajustada (TPA) conforme os tratamentos..... 40

TABELA 9 – Média ± desvio-padrão do número de leitões nascidos vivos (NV), natimortos (NM), mumificados (MM) e nascidos totais (NT) de fêmeas inseminadas com BTS ou com Androhep® Enduraguard™ (And End)..... 41

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Representação esquemática do experimento I..... 32

FIGURA 2 – Representação esquemática do experimento II..... 33

FIGURA 3 – Representação esquemática do experimento III..... 37

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A – Composição química de alguns diluentes utilizados no resfriamento de sêmen suíno..... 54

LISTA DE ABREVIATURAS

μL	Microlitros
And	Androhep®
And End	Androhep® Enduraguard™
ATP	Adenosina tri-fosfato
BHT	Butilato hidroxitolueno
BSA	Albumina sérica bovina
BTS	*Beltsville Thawing Solution*
CFDA	Diacetato de carboxifluoresceína
CIA(s)	Central(ais) de inseminação artificial
DG	Duração da gestação
DI(s)	Dose(s) inseminante(s)
DL	Duração da lactação
ECV	Escore de condição corporal visual
EDTA	Etileno disodio diamino tetraacetato
h	Horas
HEPES	*N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic acid*
IA(s)	Inseminação(ões) artificial(ais)
IDE	Intervalo desmame-estro
IM	*Membrane integrity*
MI	Membranas íntegras
mL	Mililitros
MM	Mumificados
mM	Milimolar
MOPS	*3-(N-morpholino) propanesulfonic acid*
Mot	Motilidade espermática
NAR	Acrossomas normais

NIA	Número de inseminações artificiais
NM	Natimortos
nm	Nanômetros
NT	Nascidos totais
NTPA	Média dos nascidos totais nos partos anteriores
NV	Nascidos vivos
ºC	Graus Celsius
OP	Ordem de parto
PI	Iodeto de propídio
PVP	Polivinil pirrolidona
RTM	Reflexo de tolerância ao homem na presença do macho
TC	Taxa de concepção
TP	Taxa de parto
TPA	Taxa de parto ajustada
TRE	Taxa de retorno ao estro
TRIS	Tris-hidroximetil-amino-metano

RESUMO

EFEITO DE DILUENTES NA QUALIDADE DE SÊMEN SUÍNO ARMAZENADO A 17ºC E NO DESEMPENHO REPRODUTIVO DAS FÊMEAS APÓS INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

Autor: Giancarlo Costi
Orientador: Prof. Dr. Ivo Wentz
Co-orientadores: Prof. Dr. Fernando Pandolfo Bortolozzo
Profª. Drª. Mari Lourdes Bernardi

O trabalho constou de 3 experimentos com a finalidade de avaliar a influência de três diluentes sobre a motilidade e integridade da membrana espermática e de dois diluentes sobre o desempenho de fêmeas inseminadas com sêmen armazenado, no máximo, por 48h. Nos experimentos I e II, as doses de sêmen de 100 e 80 mL, contendo 3 e 2,5 bilhões de espermatozóides, respectivamente, foram mantidas sob resfriamento a 17ºC por um período de 144h. No experimento III os diluentes utilizados foram o BTS e Androhep® Enduraguard™. Os parâmetros de avaliação da qualidade do sêmen foram os percentuais de motilidade (Mot) e de membranas íntegras (MI), no experimento I, e Mot no experimento II. No experimento III, foram avaliados as taxas de retorno ao estro (TRE), de parto (TP), de parto ajustada (TPA), número de leitões nascidos totais (NT), nascidos vivos (NV), natimortos (NM) e mumificados (MM). Foram coletados 5 ejaculados de 5 machos para o experimento I e 3 a 18 ejaculados de 18 machos para os experimentos II e III. No experimento III, foram inseminadas 882 fêmeas com ordem de parto entre 1 e 8. No experimento I foram comparados três diluentes: BTS (T1); Androhep® Enduraguard™ (T2) e Androhep® (T3). Houve uma diminuição ($P<0,05$) na Mot do T1 em relação ao T2 e T3 já nas 48h. Quanto à MI, T1 e T3 apresentaram percentuais médios superiores ($P<0,05$) ao T2. No experimento II, foram comparados dois diluentes: BTS (T1) e Androhep® Enduraguard™ (T2). Não houve diferença ($P>0,05$) para Mot entre T1 e T2, em nenhum momento de avaliação. No experimento III foram avaliados dois diluentes: BTS (T1) e Androhep® Enduraguard™ (T2). Não houve diferença ($P>0,05$) na TRE, TP, TPA, NT, NV, NM e MM entre os tratamentos. Apesar do sêmen diluído em BTS ter apresentado motilidade inferior aos outros dois diluentes, no experimento I, isto não ocorreu no experimento II. O desempenho das fêmeas inseminadas com sêmen armazenado até 48h não foi influenciado pelo diluente utilizado (BTS ou Androhep® Enduraguard™).

Palavras-chave: diluentes, sêmen suíno, motilidade, integridade de membrana, desempenho reprodutivo.

ABSTRACT

EFFECT OF EXTENDERS ON QUALITY OF SWINE SEMEN STORED AT 17ºC AND REPRODUCTIVE PERFORMANCE OF SOWS AFTER ARTIFICIAL INSEMINATION

Author: Giancarlo Costi
Advisor: Prof. Dr. Ivo Wentz
Co-Advisors: Prof. Dr. Fernando Pandolfo Bortolozzo
Profª. Drª. Mari Lourdes Bernardi

The present work consisted of 3 experiments designed to assess the influence of three extenders on motility and integrity of spermatic membrane and of two diluents on the performance of sows inseminated with semen stored up to 48 hours. In experiments I and II, semen doses of 100 and 80 mL, containing 3 and 2.5 billion sperms, respectively, were cold-stored at 17°C for 144h. In experiment III the extenders BTS and Androhep® Enduraguard™ were used. The standards for evaluation of semen quality were percentage of motility (Mot) and membrane integrity (MI) in experiment I, and Mot in experiment II. In experiment III, return to oestrus rate (TRE), farrowing rate (TP), adjusted farrowing rate (TPA), total born (NT), liveborn (NV), stillborn (NM) and mummified (NM) piglets were evaluated. In experiment I, 5 ejaculates were collected from 5 boars and 3 to 18 ejaculates from 18 boars in experiments II and III. In experiment III, 882 sows with farrowing order between 1 and 8 were used. In experiment I, three diluents were compared: BTS (TI); Androhep® Enduraguard™ (T2) and Androhep® (T3). There was a decrease (P<0.05) in Mot in T1 when compared with T2 and T3 as soon as after 48h. Regarding MI, T1 and T3 showed average percentage higher (P<0.05) than T2. In experiment II, two extenders were compared: BTS (T1) and e Androhep® Enduraguard™ (T2). There was no difference (P>0.05) for Mot between T1 and T2 at all times. In experiment III two extenders were assessed: BTS (T1) and Androhep® Enduraguard™ (T2). There was no difference (P>0.05) in TRE, TP, TPA, NT, NV, NM and MM between treatments. In spite of the fact that semen diluted with BTS showed lower motility than the other two diluents, in experiment I, this was not observed in experiment II. The performance of sows inseminated with semen stored up to 48h was not influenced by the extender (BTS or Androhep® Enduraguard™).

Key words: *extenders, swine semen, motility, membrane integrity, reproductive performance.*

M.Sc. Dissertation in Veterinary Science (Animal Reproduction)
Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre – July, 2003.

1 INTRODUÇÃO

A utilização da inseminação artificial (IA) em suínos tem aumentado de forma marcante nos últimos anos. Estima-se que mais de 99% das 19 milhões de inseminações conduzidas mundialmente são feitas com sêmen diluído, em estado líquido, usado no mesmo dia ou armazenado entre 15 a 20°C por um a cinco dias (JOHNSON, 1998).

No Brasil, no início da década de 90, o número de IAs era de 90.000 (SCHEID, 1991). Já para o ano de 2000, as estimativas foram de 1.666.000 primeiras IAs, correspondendo a 51% do plantel tecnificado e 27% do total de matrizes do país (WENTZ et al., 2000).

Diversos diluentes têm sido utilizados para resfriar e armazenar o sêmen de suínos. A maioria deles mantêm a motilidade espermática de 70% por no máximo 72 horas, na temperatura de 15 a 18°C, o que diminui o rendimento da técnica de IA devido a um menor aproveitamento dos ejaculados.

As grandes distâncias de entrega do sêmen, nos Estados Unidos, Canadá e Austrália, tornam necessária a prolongação do tempo de armazenamento e preservação das doses inseminantes (DIs) para mais de três dias, isto é, um período de três a quatro (Estados Unidos), três a cinco (Canadá) e até mesmo cinco a sete (Austrália) dias (WEITZE, 2000). No Brasil, um período maior de preservação das DIs também facilitaria o envio das mesmas para locais distantes do local de coleta, além de permitir maior aproveitamento dos machos e, com isso, uma redução de custos com sua manutenção e alojamento.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência dos diluentes BTS, Androhep® Enduraguard™ e Androhep®, no armazenamento do sêmen a 17ºC, sobre a motilidade e integridade da membrana espermática (experimento I). Também foi avaliada a influência dos diluentes BTS e Androhep® Enduraguard™ sobre a motilidade (experimento II) e o desempenho reprodutivo ao parto de fêmeas suínas inseminadas com sêmen armazenado, no máximo, por 48h (experimento III).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Inseminação Artificial (IA) na suinocultura

As primeiras tentativas de IA em suínos foram desenvolvidas na Rússia por Ivanov, em 1926 e 1927, e continuadas por Milovanov e colaboradores entre 1930 e 1936 (JOHNSON et al., 2000). Em 1931, as granjas da Rússia começaram a utilizar a IA em seus rebanhos (LEVIS, 2000).

Mais de 99% das estimadas 19 milhões de inseminações conduzidas mundialmente são feitas com sêmen diluído, usado no mesmo dia, ou armazenado entre 15 a 20°C por um a cinco dias. É provável que, 85% de todas as inseminações são realizadas no mesmo dia da coleta ou no dia seguinte (JOHNSON, 1998).

A IA na suinocultura tecnificada mundial vem aumentado exponencialmente. Segundo Deschamps, Lucia & Talamini (2000), ocorre um crescimento anual de 5% no número de inseminações realizadas no mundo. Sendo assim, estima-se que em 2006, 46% de todas as matrizes do mundo serão inseminadas. Weitze (2000) apresentou dados mostrando que 48% do plantel mundial utiliza a IA como ferramenta na reprodução, ocorrendo grandes diferenças entre países. As projeções para os próximos anos são de que o percentual do rebanho inseminado aumente significativamente, a Europa atingindo 88% do plantel utilizando IA, a América do Norte 60 a 70%, a América Latina 30% e a Ásia-Pacífica, na região da China, 30 a 35%.

No Brasil, a IA foi implantada em 1975 com a instalação de duas centrais de inseminação artificial (CIAs), uma em Estrela-RS e outra em Concórdia-SC. A partir dessas duas CIAs, a adoção da IA ocorreu, principalmente, em granjas que iniciaram a sua utilização em programas abertos ou fechados. O aumento da utilização da IA nos últimos anos deve-se a vários fatores, principalmente econômicos, resultantes da redução de custos com a manutenção de machos e ganhos em relação à qualidade e quantidade de carne produzida, com a utilização de machos geneticamente superiores e aos resultados de fertilidade obtidos com a tecnologia, semelhantes ou melhores em relação à monta natural (WENTZ et al., 2000).

Scheid (2002) relata que, no ano de 2000, foram realizadas no Brasil, 1,9 a 2,0

milhões de primeiras inseminações, representando 48 a 50% do plantel tecnificado e 26 a 28% do total de matrizes.

2.2 Diluentes para sêmen suíno

2.2.1 Histórico

Segundo Levis (2000), a viabilidade do sêmen suíno, em condições laboratoriais, foi primeiramente estudada, em 1907, por Lewis no colégio agrícola de Oklahoma. Depois que os cientistas conseguiram coletar o sêmen do cachaço, observaram que os espermatozóides não sobreviviam por muito tempo, por isso tornou-se necessário encontrar uma maneira de prolongar a vida das células espermáticas. Foi a partir daí que começaram as pesquisas para encontrar um meio onde a viabilidade das células espermáticas pudesse ser prolongada. Surgiram então, na Rússia, os primeiros diluentes para o sêmen suíno.

Os eventos cronológicos referentes à elaboração dos diluentes para o sêmen suíno são descritos por Levis (2000):

- 1931: Foi produzido um dos primeiros diluentes na Rússia, e era elaborado com uma solução isotônica de sulfato de sódio contendo pequenas quantidades de sulfato de potássio, cloreto de cálcio e peptona;
- 1940 – 1960: Muitos pesquisadores investigaram o benefício da gema de ovo, leite e saturação por CO_2 na manutenção da viabilidade das células espermáticas;
- 1970 – 1980: Foram desenvolvidos diluentes que apresentavam uma maior facilidade para a sua utilização como o Kiev, Modena, Modena Modificado e BTS.

De acordo com Weitze (1991), os diluentes desenvolvidos entre 1980 e 1990 visavam prolongar a viabilidade espermática. A exemplo dos diluentes de longa preservação utilizados em outras espécies, foram incluídas macromoléculas na composição dos diluentes para o sêmen suíno, objetivando uma proteção das membranas celulares contra os danos do choque térmico (ALTHOUSE et al., 1998; LEVIS, 2000). A albumina sérica bovina (BSA), uma proteína plasmática obtida do sangue de bovinos, é a macromolécula mais utilizada nos diluentes suínos (WEITZE, 1991). Além disso, esses diluentes passaram a conter em sua composição um tampão anfótero. Entre esses diluentes são citados o BW25, Androhep® e MR-A®.

2.2.2 Função e composição dos diluentes

Os diluentes de sêmen possuem várias funções básicas, tais como aumentar o volume total do ejaculado, suprir a necessidade de nutrientes para a produção de energia (glicose), permitir a proteção dos espermatozóides contra o choque térmico (BSA), apresentar tampão capaz de controlar a flutuação do pH (bicarbonato de sódio, TRIS, HEPES e MOPS), possuir sais básicos (como cloreto de sódio e cloreto de potássio), permitir um balanço osmótico e a inibição do desenvolvimento bacteriano (ALTHOUSE, 1997; KUSTER & ALTHOUSE, 1999; JOHNSON et al., 2000; LEVIS, 2000).

Existe uma grande variedade de diluentes comerciais para sêmen suíno. Diluentes de curta duração são bastante utilizados nos países da Europa em função das pequenas distâncias entre granjas. Já na América do Norte, por causa das grandes distâncias entre granjas, são necessários diluentes de longa duração (KUSTER & ALTHOUSE, 1999; JOHNSON et al., 2000; LEVIS, 2000).

Com base no período de manutenção da viabilidade e da capacidade fecundante do espermatozóide, os diluentes utilizados na IA de suínos têm sido tradicionalmente classificados em três grupos, segundo Levis (2000): os de curta duração (um a dois dias), os de média (três a cinco dias) e os de longa (mais de seis dias). Entretanto, a maioria deles apresenta limitações com relação à manutenção da viabilidade espermática, as quais ficam reduzidas após 72h de armazenamento do sêmen (WEITZE, 1991; ALTHOUSE, 1997).

Atualmente, há uma alta competição pela venda de diluentes, fazendo com que a composição química de alguns novos diluentes seja secreta. Segundo Levis (2000), mesmo na divulgação de resultados científicos, os autores omitem a composição dos diluentes utilizados.

De modo geral, os diluentes de curta duração apresentam menores custos que os de longa. Apesar de seu maior custo, os diluentes de longa duração possuem a vantagem de poder evitar a realização de coletas e processamento de sêmen nos finais de semana. Seu uso também possibilita uma diminuição no custo de transporte para o produtor, uma vez que um grande volume de sêmen pode ser comprado em uma única entrega (LEVIS, 2000).

De acordo com Scheid (1991), os principais diluentes de curta duração são o BTS e o Kiev. No Brasil, o diluente Kiev foi bastante utilizado até 1986, sendo em seguida substituído pelo BTS, especialmente devido ao menor custo e por proporcionar

um aumento no período de armazenamento do sêmen.

O BTS, o Androhep® e o MR-A® são os diluentes mais utilizados no mundo (JOHNSON, 1998). Segundo Levis (2000), o BTS é o diluente mais utilizado devido à facilidade de fabricação, baixo custo de produção e baixo preço de comercialização. Entretanto, é recomendado o uso da dose inseminante (DI) processada com BTS, no máximo, até três dias de armazenamento, a 15°C (JOHNSON, 1998).

2.2.2.1 Fonte de energia

Primariamente, o espermatozóide produz energia através da via glicolítica que ocorre na bainha mitocondrial da peça intermediária da cauda. Os diluentes para o sêmen suíno utilizam a glicose como fonte primária de energia. Segundo Johnson et al. (2000), o alto percentual de glicose, em muitos diluentes, causa uma redução considerável do pH intracelular (abaixo de 6,0). Essa acidose intracelular diminui a sobrevivência das células espermáticas durante o período de armazenamento. Embora outras fontes de energia tenham sido incluídas nos diluentes (galactose, frutose, ribose e trealose), elas não apresentaram qualquer benefício em relação à glicose (LEVIS, 2000).

2.2.2.2 Tampões

A concentração dos íons hidrogênio (H^+) na solução vai determinar o pH. O pH varia de 6,8 a 7,4 e de 7,0 a 7,6 nas frações rica e pobre do ejaculado, respectivamente (HANCOCK & HOVELL, 1959). As células espermáticas e bactérias produzem metabólitos como o ácido lático. As concentrações do ácido lático aumentam durante o armazenamento do sêmen e o pH vai diminuindo conforme aumenta o tempo de armazenagem. Assim, a função dos tampões no diluente é minimizar as flutuações de pH devido a produção dos metabólitos durante a conservação do sêmen. Os tampões simples, como o bicarbonato de sódio e o citrato de sódio, apresentam uma faixa de tamponamento limitada. O TRIS tem uma larga faixa de tamponamento (pH 7 a 9), porém é dependente da temperatura. MOPS e HEPES são tampões que suportam amplas variações de pH, agindo em íons bipolares, ou seja, em íons com carga positiva ou negativa. O MOPS admite variações de pH entre 6,5 e 7,9 e o HEPES entre 6,8 e 8,2. Esses dois tampões não são dependentes de variações de temperatura (LEVIS, 2000).

2.2.2.3 Eletrólitos

De acordo com Levis (2000), os eletrólitos são utilizados para regular a pressão

osmótica. Às vezes, o cloreto de potássio e cloreto de sódio são adicionados aos diluentes para balancear a pressão osmótica. Uma solução hipertônica, onde há uma pressão osmótica maior que a celular, causa uma perda de água e resulta na diminuição de volume da célula espermática. Inversamente, soluções hipotônicas vão produzir um fluxo de água para o interior da célula espermática e podem romper o espermatozóide. A pressão osmótica ideal para o sêmen suíno diluído é de 290 a 300 miliosmóis.

2.2.2.4 Antimicrobianos

É praticamente impossível coletar sêmen suíno livre de contaminação bacteriana e, também, a temperatura de armazenamento (15-18^{o}C) não inibe o crescimento bacteriano. Ao avaliar o comportamento da população bacteriana, em amostras de sêmen armazenadas em BTS em diferentes temperaturas (5, 12 e 17°C), na ausência de antimicrobianos, Katzer et al. (2001) verificaram que após 120h de armazenamento as amostras mantidas a 5°C apresentavam um menor número de unidades formadoras de colônias bacterianas, em relação às mantidas a 12 e 17°C, confirmando que as temperaturas usuais de armazenamento do sêmen suíno (15 a 18°C) não impedem a multiplicação bacteriana.

Muitos metabólitos produzidos pelas bactérias têm efeitos deletérios sobre a sobrevivência do espermatozóide (ALTHOUSE, 1997; LEVIS, 2000). Os antimicrobianos mais popularmente usados hoje são a gentamicina, lincomicina, neomicina e espectinomicina (JOHNSON et al., 2000; LEVIS, 2000). A legislação da comunidade européia exige que seja adicionado aos diluentes uma combinação de antimicrobianos (penicilina, estreptomicina, lincomicina e espectinomicina) que tenham ação contra a leptospirose e micoplasmose (JOHNSON et al., 2000). Não há trabalhos conduzidos para avaliar se os componentes do diluente ou pH afetam a eficácia do antimicrobiano (LEVIS, 2000).

Poolpem, Flowers & Almond (1998) compararam a ação de cinco antibacterianos adicionados ao diluente BTS (amicacina, gentamicina, neomicina e uma combinação de penicilina com estreptomicina) sobre o crescimento bacteriano. A gentamicina e neomicina foram significativamente mais eficazes ($P<0,05$) no controle do crescimento bacteriano do sêmen.

2.2.2.5 Estabilizantes de membrana

A célula espermática é envolvida por uma membrana plasmática. Uma das principais funções da membrana é atuar como uma barreira para a difusão passiva de solutos, preservando a distinção e identidade das células (QUINN, 1985). A membrana plasmática do espermatozóide é uma estrutura dinâmica que facilita a maciça reorganização durante os eventos da capacitação e reação do acrossoma (BUHR & PETTITT, 1996).

A membrana é formada essencialmente por uma fina película de moléculas de lipídeos e proteínas e é polarizada dentro de três segmentos: cabeça, peça intermediária e cauda. Componentes especiais têm sido adicionados nos diluentes para sêmen suíno com o intuito de prevenir ou retardar alterações na estrutura e função da membrana plasmática. Esses componentes são a albumina sérica bovina (BSA), butilato hidroxitolueno (BHT), etileno-disodio-diamino-tetraacetato (EDTA), polivinil pirrolidona (PVP-40) e álcool polivinílico. É bem sugerido que a BSA prolonga a motilidade espermática por substituir ou manter a coesão das lipoproteínas das células espermáticas removendo o fator inibitório do espermatozóide ou promovendo uma proteção contra o efeito da diluição. O BHT é um antioxidante e possui uma solubilidade extremamente baixa em soluções aquosas (LEVIS, 2000). A adição de BHT no BTS, aumentou significativamente os percentuais de motilidade e de acrossomas normais do sêmen armazenado por 6 dias a 5^{o}C (BAMBA & CRAN, 1992). Korniewicz, Szczesniak-Fabianczyk & Smorag (1996) substituíram a BSA por PVP-40 no Androhep®, mas observaram diminuição no tempo de sobrevivência das células espermáticas, taxa de prenhez e tamanho da leitegada.

A BSA foi utilizada nos diluentes de sêmen suíno com a função de prolongar o armazenamento e, especialmente, a motilidade espermática. O mecanismo da ação protetora da BSA não é bem claro. A ação primária da BSA no diluente é, com certeza, a estimulação da motilidade espermática. Nesse aspecto, a BSA possui um melhor efeito que outras substâncias comerciais avaliadas, como PVP, α-lactoalbumina, β-lactoglobulina, ovoalbumina ou π-globulina. Não é possível descrever o mecanismo exato da BSA. Aparentemente, ela influencia a motilidade e direção do espermatozóide sem que altere os níveis de ATP (WEITZE, 1991).

O EDTA é uma substância quelante que captura íons bivalentes, especialmente o cálcio (Ca^{++}), e acredita-se que ele limita o movimento para o interior da célula espermática, prevenindo a iniciação da capacitação e reação acrossomal. A inclusão de

EDTA nos diluentes foi um passo importante e muito difundido no uso do sêmen armazenado de forma líquida (JOHNSON et al., 2000).

2.3 Resfriamento e armazenamento do sêmen suíno

A motilidade das células espermáticas é determinada pela produção de energia. Como a quantidade de energia de cada célula é limitada, o sêmen deve ser armazenado nas temperaturas nas quais o consumo de energia é o menor possível. No entanto, a grande sensibilidade do espermatozóide suíno a temperaturas inferiores a 15°C resulta em uma diminuição da taxa de sobrevivência espermática (DE LEEUW, COLENBRANDER & VERKLEIJ, 1991; MAXWELL & JOHNSON, 1997). Após a diluição, o sêmen suíno é armazenado em temperaturas entre 16 e 18ºC (LAFOREST & ALLARD, 1996; WEITZE, 2000). Porém, essa temperatura apresenta limitações quando o sêmen é estocado por períodos prolongados, em virtude de não interromper totalmente o metabolismo dos espermatozóides, que continuam produzindo metabólitos, os quais se acumulam e interferem na motilidade espermática. Além disso, esta faixa de temperatura não impede a multiplicação bacteriana, que também influencia a qualidade do sêmen e o período de armazenamento (WEITZE, 1990).

De acordo com Levis (2000), vários fatores podem influenciar a qualidade espermática durante o processo de resfriamento. Esses fatores podem estar relacionados com a velocidade de resfriamento, diferenças entre cachaços e ejaculados, composição dos diluentes, fatores inerentes ao espermatozóide, susceptibilidade ao choque térmico, além das taxas de diluição do sêmen.

O choque térmico pelo frio conduz a lesões, especialmente no acrossoma do espermatozóide, com despreendimento e perda do conteúdo enzimático (PURSEL, JOHNSON & RAMPACEK, 1972; TASSERON, AMIR & SCHINDLER, 1977). Desta forma, qualquer dano ocorrido no acrossoma pode inibir a capacidade fecundante do espermatozóide (WOELDERS, 1991), uma vez que, ejaculados suínos com elevado percentual de acrossomas anormais têm mostrado reduzida fertilidade (PURSEL, JOHNSON & RAMPACEK, 1972).

Além das condições do meio em que foram diluídos, dois importantes fatores influenciam a função das células espermáticas após a ejaculação e durante o armazenamento *in vitro*: os cuidados com a temperatura na qual o sêmen é coletado e a temperatura de armazenamento após a diluição (JOHNSON, 1998). Outros fatores importantes são a forma de distribuição e temperatura de transporte (LANDSVERK,

2000).

De acordo com Johnson et al. (2000), as alterações funcionais e estruturais no espermatozóide durante o armazenamento são um processo de envelhecimento natural e podem ser determinadas pelas condições e tempo de armazenamento. O sucesso da fecundação é influenciado por dois períodos de envelhecimento: durante o armazenamento *in vitro* por um período maior que cinco dias, e envelhecimento *in vivo* após a IA, que é determinado pelo intervalo entre IA e ovulação. Assim, a capacidade fecundante do sêmen armazenado sob forma líquida é gradualmente diminuída durante o período de armazenamento. Por isso, a avaliação da viabilidade e capacidade fecundante do sêmen diluído *in vitro* é de fundamental importância para determinar durante quanto tempo o sêmen armazenado permanece viável (HUO, MA & YANG, 2002).

As alterações funcionais durante o período de armazenamento ocorrem em diferentes partes do espermatozóide, como mitocôndrias, cauda, acrossoma e membrana plasmática, porém, essas alterações ainda não são bem entendidas. A redução da motilidade ocorre durante o período de armazenamento e é o parâmetro mais utilizado para julgar a diminuição da capacidade fecundante (WEITZE, 1991). A motilidade progressiva do espermatozóide é um indicador do status metabólico e da integridade de membranas. Um importante indicador de lesão da membrana plasmática durante o armazenamento é a mudança de sua permeabilidade (JOHNSON et al., 2000), a qual pode ser confirmada pela entrada de corantes fluorescentes na célula espermática, como o iodeto de propídio (PI).

Embora a capacidade fecundante do sêmen dependa tanto da qualidade (motilidade, morfologia, integridade funcional e contaminação bacteriana) como da quantidade de espermatozóides, a estimativa da motilidade é de fundamental importância no controle diário da qualidade do sêmen (JOHNSON et al., 2000).

Em função dos diluentes de longa duração serem um produto de melhor qualidade, muitos produtores preferem utilizar esses diluentes para não correrem o risco de diminuir o desempenho reprodutivo (LEVIS, 2000).

2.4 Qualidade espermática

Waberski et al. (1994) compararam o armazenamento de sêmen processado em BTS e Androhep®, durante 120h de armazenamento, e não verificaram diferença significativa ($P>0,05$) na motilidade e acrossomas normais entre os diluentes, durante

todo o período. Houve uma redução significativa na motilidade (P<0,05) e na integridade de acrossoma (P<0,05), respectivamente, nas 48 e 72h de conservação, em ambos os diluentes. O sêmen armazenado por mais de 96h apresentou uma significativa queda nos valores dos dois parâmetros analisados *in vitro,* quando comparados ao armazenado por 48 e 72h.

Althouse (1997) comparou os diluentes BTS e Androhep®, durante um período de 120h de armazenamento da DI a 17°C, não observando diferença significativa (P>0,05) entre os diluentes quanto à motilidade (62 e 73%) e o percentual de acrossomas normais (74 e 76%) para BTS e Androhep®, respectivamente.

Em trabalho realizado por Kuster & Althouse (1999) para comparar a motilidade dos diluentes Androhep® e X-CELL™, num período de 144h, não houve diferença significativa (P>0,05) entre os diluentes em nenhum momento.

Ao verificar a influência do diluente sobre os parâmetros motilidade e morfologia de acrossoma do sêmen suíno resfriado a 17°C, Bandeira-Kotzias (1999) não constatou diferença significativa (P>0,05) entre BTS e Androhep®, após 48h de armazenamento. Os valores médios foram de 75 e 70% para motilidade e de 86 e 85% de acrossomas normais para Androhep® e BTS, respectivamente.

Embora o BTS seja considerado um diluente de curta duração, Reis et al. (2000) observaram que, para alguns machos, a motilidade esteve próxima de 60% até 168h de armazenamento. Da mesma forma, ao avaliar ejaculados oriundos de oito machos, diluídos em BTS e mantidos a 15°C, Ohata (2001) também constatou valores de motilidade superiores a 60%, para alguns machos, após 96h de armazenamento.

Katzer (2002) avaliou o sêmen suíno diluído em BTS e Androhep® durante 120h, e observou percentuais de motilidade (77,4 e 75,6%), de acrossomas normais (85,2 e 89,3%) e de membranas íntegras (69,0 e 66,2%) semelhantes para BTS e Androhep®, respectivamente.

Vazquez et al. (1998) compararam o efeito da manutenção em BTS com MR-A®, durante 216h de conservação, sobre a viabilidade espermática. Não houve diferença (P>0,05) entre os diluentes nos percentuais de integridade de membrana, avaliada com o uso do corante fluorescente diacetato de carboxifluoresceína (CFDA), durante todo o período (63 e 65% para BTS e MR-A®, respectivamente). Entretanto, o MR-A® apresentou motilidade superior (61%) quando comparado ao BTS (55%), após 96h de armazenamento.

Lietmann (1992), ao comparar a capacidade de fecundação das DIs diluídas em BTS e Androhep®, observou uma queda significativa na taxa de fecundação com o uso de sêmen armazenado por 48h, em BTS. Por outro lado, a queda ocorreu nas 72h, quando o sêmen foi armazenado em Androhep®. Apesar dessas diferenças na queda da taxa de fecundação, não houve diferença significativa na motilidade (maior que 70%) e acrossomas normais (igual a 80%), entre os dois diluentes, nas 120h de armazenamento.

Baltes (1993) não observou diferença significativa nos percentuais de motilidade espermática (80 e 76%) e de fecundação para os diluentes BTS e Androhep®, respectivamente, após 120h de armazenamento do sêmen a 17°C.

Scheid et al. (1993), estudando a preservação das características espermáticas e a fertilidade do sêmen suíno conservado nos diluentes Kiev, BTS e Reading, na temperatura de 15 a 18°C, verificaram uma superioridade dos diluentes BTS e Reading na preservação do sêmen por 7 dias, os quais apresentaram motilidade espermática semelhante entre si (65 *versus* 67%, respectivamente).

Na Tabela 1 são apresentados alguns dos resultados obtidos com o armazenamento de sêmen suíno em temperaturas entre 14 e 17°C, com os diluentes BTS e Androhep®.

2.5 Fertilidade e desempenho reprodutivo

Quando a dose de sêmen é armazenada por períodos superiores a 72h, mesmo com o emprego de diluentes de longa duração, os parâmetros reprodutivos, como a taxa de parto (TP) e o tamanho da leitegada podem ser afetados (WEITZE, 1991).

Blichfeldt, Almlik & Stavne (1988) estudaram o desempenho reprodutivo de fêmeas inseminadas com os diluentes BTS e Kiev, armazenados entre 15 e 20°C, contendo 2 x 10^9 de espermatozóides, em diferentes períodos de armazenamento (0-24, 24-48 e 48-72h). Houve uma diminuição de 10% na TP com ambos os diluentes, quando utilizados com três dias de armazenagem. No entanto, o BTS foi superior quanto ao tamanho de leitegada, apresentando 0,5 leitão a mais.

Estudando a influência do período de armazenamento das DIs diluídas em BTS e Androhep® e armazenadas a 15°C, sobre a taxa de fecundação, Lübbert zur Lage (1991) não verificou diferença significativa entre os diluentes, ao inseminar fêmeas com sêmen armazenado até 24h. Com sêmen armazenado por 120h, no entanto, foram observadas reduções significativas na taxa de fecundação, para os dois diluentes.

Tabela 1 – Percentuais de motilidade (Mot), de acrossomas normais (NAR) e de membranas íntegras (MI) de sêmen suíno armazenado em BTS e/ou Androhep® (And), em temperaturas entre 14 e 17°C.

Autores	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Diluente	Mot (%)	NAR (%)	MI (%)
Weber (1989)	15	24	And	77,5	80,6	-
Lübbert zur Lage (1991)	15	144	BTS	76,5	86	-
			And	79	92	
Sather, Harbison & Seth, (1991)	15	120	BTS	67	75	-
Lietmann (1992)	15	120	BTS	60-70	73	-
			And	70	76	-
Scheid et al. (1993)	17	120	BTS	68,7	91	-
Baltes (1993)	17	120	BTS	76	75	70
			And	80	80	81
Waberski et al. (1994)	17	120	BTS	62	74	-
			And	73	76	-
Vasquez et al. (1998)	17	96	BTS	55	85	-
Althouse et al. (1998)	14	48	And	>80	90	-
	17			>80		
Bandeira-Kotzias (1999)	17	48	BTS	70	85	-
			And	75	85,5	
Paulenz, Kommisrud & Hofmo (2000)	15	96	BTS	60	81,5	-
Reis et al. (2000)	17	120h	BTS	>60	>90	>70
Ohata (2001)	15	120h	BTS	>60	-	-
Katzer (2002)	15	120h	BTS	77,4	85,2	69,0
			And	75,6	89,3	66,2

Em estudo retrospectivo realizado por Hofmo (1991), na Noruega, onde foram analisados dados de fertilidade de sêmen suíno diluído em BTS e armazenado por um período máximo de 72h, houve um decréscimo de 5% na taxa de parto e de 0,35 nascidos vivos, quando o sêmen foi utilizado após 48h de armazenamento. Sather, Harbison & Seth (1991) verificaram uma redução significativa da taxa de concepção (TC) para o sêmen armazenado em BTS por mais de três dias (menor que 30%), em comparação ao armazenado por até três dias (48%).

Bortolozzo et al. (1993) pesquisaram o efeito do armazenamento da DI por 24, 48 e 72h, em BTS, sobre a taxa de fecundação e o número de espermatozóides acessórios, após a inseminação artificial de leitoas. Com relação à taxa de fecundação, não foi observada diferença significativa entre o sêmen armazenado por 24 (77,4%), 48 (77,3%) e 72h (72,4%). Waberski et al. (1994) observaram taxas de fecundação

semelhantes (P>0,05) para Androhep® (79%) e BTS (68%) com o sêmen armazenado por 48h.

Laforest & Allard (1996) compararam diferentes diluentes ao longo de 168h (BTS, MR-A®, Modena e Androhep®) e concluíram que o BTS é tão eficiente quanto os diluentes mais complexos. Nas 96h, todos os diluentes avaliados apresentaram taxa de prenhez que variou de 83 a 89%, sem diferença significativa entre eles (P>0,05). Quanto ao tamanho da leitegada, o BTS, MR-A® e Androhep® resultaram em 11,4; 11,3 e 11,6 leitões, em média, respectivamente, enquanto o Modena foi significativamente (P<0,05) inferior, com 9,9 leitões.

Althouse (1997) sugere a inclusão de um bilhão de espermatozóides na DI para cada dia a mais de armazenagem, a partir de 48h. O objetivo de aumentar o número total de espermatozóides por dose é diminuir as perdas relacionadas à fertilidade associadas ao sêmen estocado por longos períodos.

Huinker (1998) realizou trabalho com o propósito de verificar a fertilidade de fêmeas inseminadas com sêmen diluído em Androhep®, armazenado por até quatro dias ou mais. Os resultados obtidos quanto à taxa de parto e nascidos totais foram de 77,5% e 11,5 leitões, respectivamente.

Kuster & Althouse (1999), ao comparar o desempenho reprodutivo de leitoas entre os diluentes Androhep® e X-CELL™, verificaram que houve diferença significativa (P<0,001) quanto à taxa de parto somente entre 120 e 144h de armazenamento (78,6 e 85,6%, respectivamente). Quanto aos valores de leitões nascidos totais, o único momento em que ocorreu diferença significativa (P<0,01) entre os tratamentos foi com sêmen armazenado por 96-120h (9,0 leitões para Androhep® e 10,4 leitões para o X-CELL™).

Na Tabela 2 são apresentados alguns resultados do desempenho reprodutivo com a utilização de vários diluentes para sêmen suíno armazenado por até 192h, em temperaturas entre 15 e 20°C.

Tabela 2 – Taxa de concepção (TC), taxa de parto (TP), número de leitões nascidos vivos (NV) e número de leitões nascidos totais (NT) após inseminação com sêmen suíno diluído em vários diluentes e armazenado por até 192h em temperaturas entre 15 e 20°C.

Autores	Diluente	Concentração (bilhões de espermatozóides)	Tempo (h)	TC (%)	TP (%)	NV (média)	NT (média)
Kuiper & Haas (1980)	IVT	4	0-48	-	78,1	-	10,9
	Kiev	4	0-48	-	79,2	-	10,8
Johnson et al. (1980)	BL-1	3	0-24	-	67,9	-	10,6
		3	24-48	-	58,3	-	9,8
		3	48-72	-	51,7	-	8,9
	Kiev	3	0-24	-	74,5	-	10,6
		3	24-48	-	67,5	-	9,9
		3	48-72	-	69,5	-	9,7
Waberski (1988)	BW 25	2,5	0-72	85,2	-	-	10,6
		2,5	72-120	80,7	-	-	9,9
	Androhep®	2,5	0-72	83,6	-	-	10,4
		2,5	72-120	78,3	-	-	10,1
	Kiev + IVT	2,5	0-72	86,6	-	-	10,3
Hofmo (1991)	BTS	2	4-14	-	67,8	10,9	12,0
		2	28-38	-	69,8	10,7	11,7
		2	52-62	-	64,6	10,6	11,6
Reed (1991)	Zorpva	-	24-72	-	-	-	10,8
		-	72-120	-	-	-	9,9
Lyczynski & Kolat (1996)	MR-A®	4	0-48	84,0	-	10,0	11,1
		4	48-96	81,4	-	10,4	11,5
		4	96-144	71,9	-	10,3	11,6
		4	144-192	67,3	-	9,6	10,7
Hofmo, Kommisrud & Schested (1998)	BTS	2,5	48-72	88,8	82,6	-	12,6
	MR-A®	2,5	96-120	89,6	83,8	-	12,3
Lyczynski et al. (2000)	MR-A®	4	72	93,5	91,3	10,3	-
	Merck III	4	72	91,3	87,0	9,6	-
	Androstar®	4	72	93,5	87,0	10,0	-

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Experimentos I e II

3.1.1 Local e período de execução

O experimento I foi realizado no Laboratório do Setor de Suínos, na Faculdade de Veterinária (FAVET) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), durante os meses de março e abril de 2002. O experimento II foi desenvolvido em uma Central de Inseminação Artificial (CIA) de uma empresa situada no oeste catarinense, no período de maio a julho de 2002.

3.1.2 Procedimentos experimentais gerais

Os procedimentos descritos a seguir foram comuns aos dois experimentos. Quando alguma alteração foi efetuada, a mesma está descrita, no item correspondente.

3.1.2.1 Coleta do sêmen

A coleta de sêmen foi realizada pela técnica da mão enluvada, descrita por Hancock & Hovell (1959), com o auxílio de um manequim regulável localizado na baia de coleta. A coleta do ejaculado total foi realizada em um saco plástico atóxico descartável, próprio para coleta (experimento I) ou em um copo plástico atóxico descartável (experimento II), protegido por um recipiente isotérmico, previamente aquecido a 38ºC. A fração gelatinosa foi separada por filtro acoplado ao copo coletor e, após a coleta, o ejaculado foi avaliado macroscopicamente (cor, odor e aspecto) e imediatamente depositado em banho-maria a 32-34ºC, para posterior avaliação e processamento.

3.1.2.2 Processamento do ejaculado

3.1.2.2.1 Avaliação macroscópica e microscópica do ejaculado

Após a coleta, o sêmen foi avaliado quanto à cor, volume (determinado pelo

peso), aspecto e odor para fins de descarte das amostras que não estivessem dentro dos parâmetros normais para essas características.

Uma alíquota do sêmen *in natura* (três a quatro gotas) foi colocada em 2mL de formol citrato 2,94% para avaliação da morfologia espermática, sendo utilizados machos com alterações morfológicas inferiores a 20%. Também foram avaliadas as seguintes características microscópicas: percentual de motilidade espermática, grau de aglutinação e concentração espermática. Os critérios utilizados para a escolha dos ejaculados a serem processados foram os de motilidade superior a 70% e aglutinação inferior a duas cruzes por campo microscópico. A concentração espermática foi determinada através de fotocolorimetria (SpermaCue®), no experimento I, e por contagem direta em câmara hemocitométrica de Neubauer, no experimento II. Durante a avaliação microscópica, o sêmen foi mantido em banho-maria a 32-34ºC, por no máximo cinco minutos.

3.1.2.2.2 Diluição e envase do sêmen

Cada ejaculado foi fracionado e diluído, em temperatura de 32-34ºC, conforme os tratamentos descritos a seguir, para cada experimento. Foi realizada uma pré-diluição (1:1) de cada fração do ejaculado e aguardados dez minutos antes da diluição final. As doses de sêmen continham 3×10^9 de espermatozóides em 100mL (experimento I) ou $2,5 \times 10^9$ de espermatozóides em 80mL (experimento II). No experimento I, o sêmen foi envasado em bisnagas plásticas, as quais estavam em estufa a 22ºC, previamente ao envase. No experimento II, o sêmen foi envasado em flexitubos plásticos com colorações diferentes, que indicavam o diluente utilizado.

3.1.2.2.3 Resfriamento e armazenamento das amostras de sêmen

Antes de serem armazenadas na conservadora, as amostras de sêmen foram pré-resfriadas durante 120 minutos na temperatura ambiente da sala de processamento, a qual era mantida entre 20 e 22ºC.

Em todos os tratamentos, as amostras de sêmen foram mantidas sob resfriamento por um período total de 144h. A temperatura de armazenamento utilizada foi 17 ± 1ºC, a qual foi monitorada diariamente com termômetro de máxima e mínima. As amostras foram submetidas à agitação leve, uma vez ao dia, para a ressuspensão das células espermáticas.

3.1.2.3 Avaliação da qualidade espermática

A qualidade do sêmen foi avaliada através dos percentuais de motilidade (experimentos I e II) e de membranas íntegras (experimento I).

3.1.2.3.1 Percentual de motilidade (Mot)

De cada amostra, após sua remoção da conservadora de sêmen, foi obtida uma alíquota de 5mL de sêmen, onde foi mantida em banho-maria a 38ºC por 10 minutos. A motilidade foi avaliada entre lâmina e lamínula pelo método subjetivo, em microscópio de campo claro, com aumento de 100x, sendo expressa em percentual de espermatozóides móveis. Foram avaliadas, no mínimo, duas amostras de cada tratamento, em intervalos de 24h, durante 144h.

3.1.2.3.2 Percentual de membranas íntegras (MI)

A integridade das membranas foi avaliada com base no método descrito por Harrison & Vickers (1990), sendo que uma solução contendo 475µL de sêmen resfriado de cada amostra, 10µL de diacetato de carboxifluoresceína (20mM), 5µL de iodeto de propídio (7,3mM) e 10µL de paraformaldeído (1,7mM) foi incubada por oito minutos a 30ºC em banho-maria. Após este período de incubação, foi examinada uma alíquota de 5µL, entre lâmina e lamínula, em microscópio de epifluorescência (filtro EX/DM/BF= 450-490/510/520nm), em aumento de 1000x. Foram avaliadas 200 células espermáticas em cada amostra, nas 48, 96 e 144h de armazenamento.

As células espermáticas avaliadas foram classificadas conforme o padrão de coloração estabelecido por Ortman & Rodriguez-Martinez (1994). Para fins de comparação dos tratamentos, foi considerado o percentual de espermatozóides com as membranas íntegras, isto é, aqueles corados em verde.

3.1.3 Delineamento experimental

Os experimentos foram executados como delineamentos inteiramente casualizados. As unidades experimentais foram as doses de sêmen (experimentos I e II).

3.1.3.1 Experimento I

Foram utilizados, como doadores de sêmen, cinco machos híbridos de linhagens diferentes. Esses animais apresentavam idade entre 12 e 28 meses e foram submetidos

ao manejo de coleta a cada cinco a sete dias. Foram utilizados cinco ejaculados de cada macho, cada qual fracionado e distribuído em três tratamentos:

- Tratamento 1 (T1): diluição em BTS (*Beltsville Thawing Solution*)
- Tratamento 2 (T2): diluição em Androhep® Enduraguard™
- Tratamento 3 (T3): diluição em Androhep®

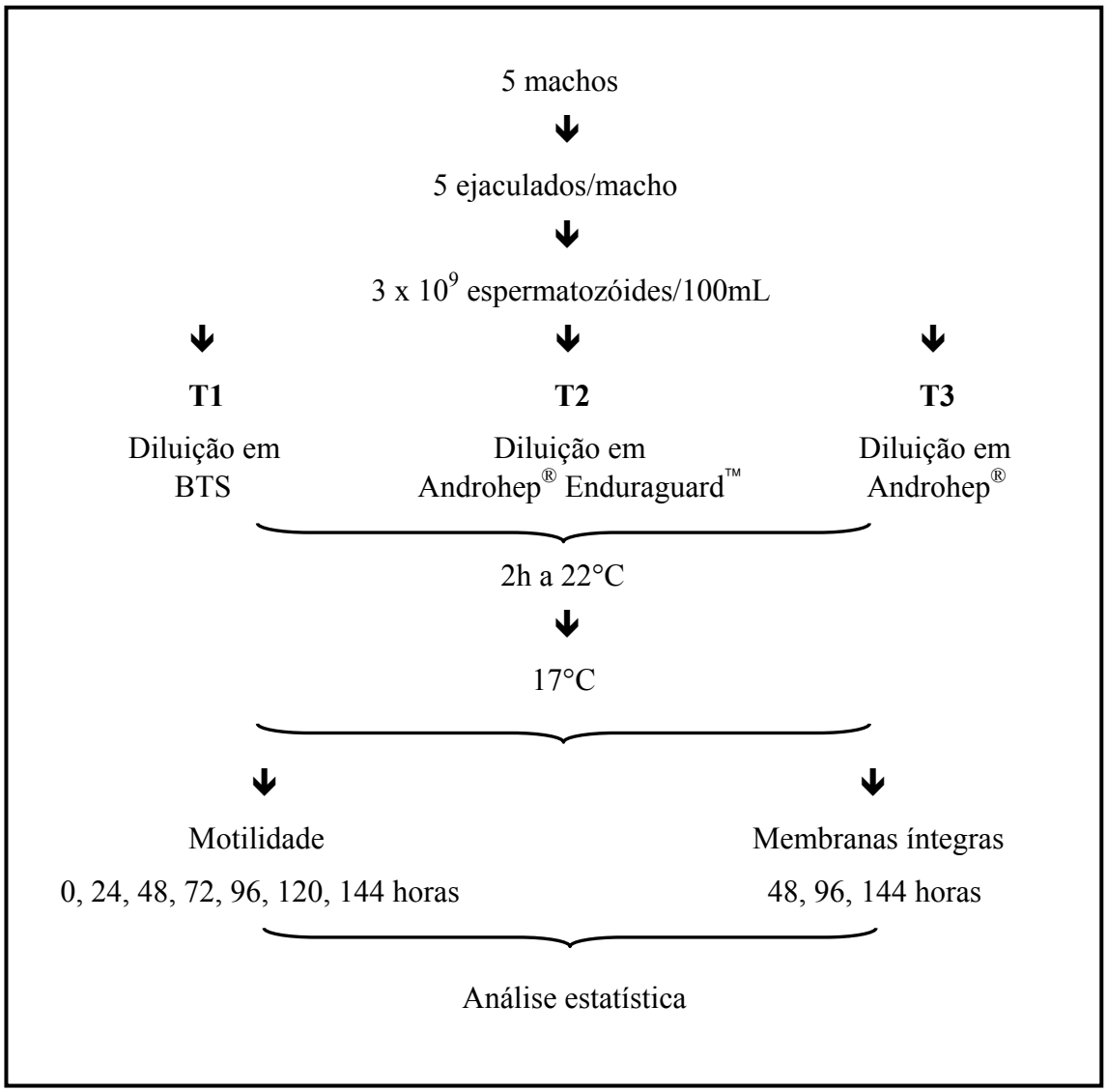

Figura 1: Representação esquemática do experimento I.

3.1.3.2 Experimento II

Foram utilizados 18 machos híbridos da linhagem Ag-Pic 420® como doadores de sêmen, com idade entre 12 e 40 meses. Esses machos foram submetidos ao manejo de coleta a cada três a sete dias. Foram utilizados três a doze ejaculados de cada macho,

cada qual fracionado e distribuído em dois tratamentos:

- Tratamento 1 (T1): diluição em BTS (*Beltsville Thawing Solution*)
- Tratamento 2 (T2): diluição em Androhep® Enduraguard™

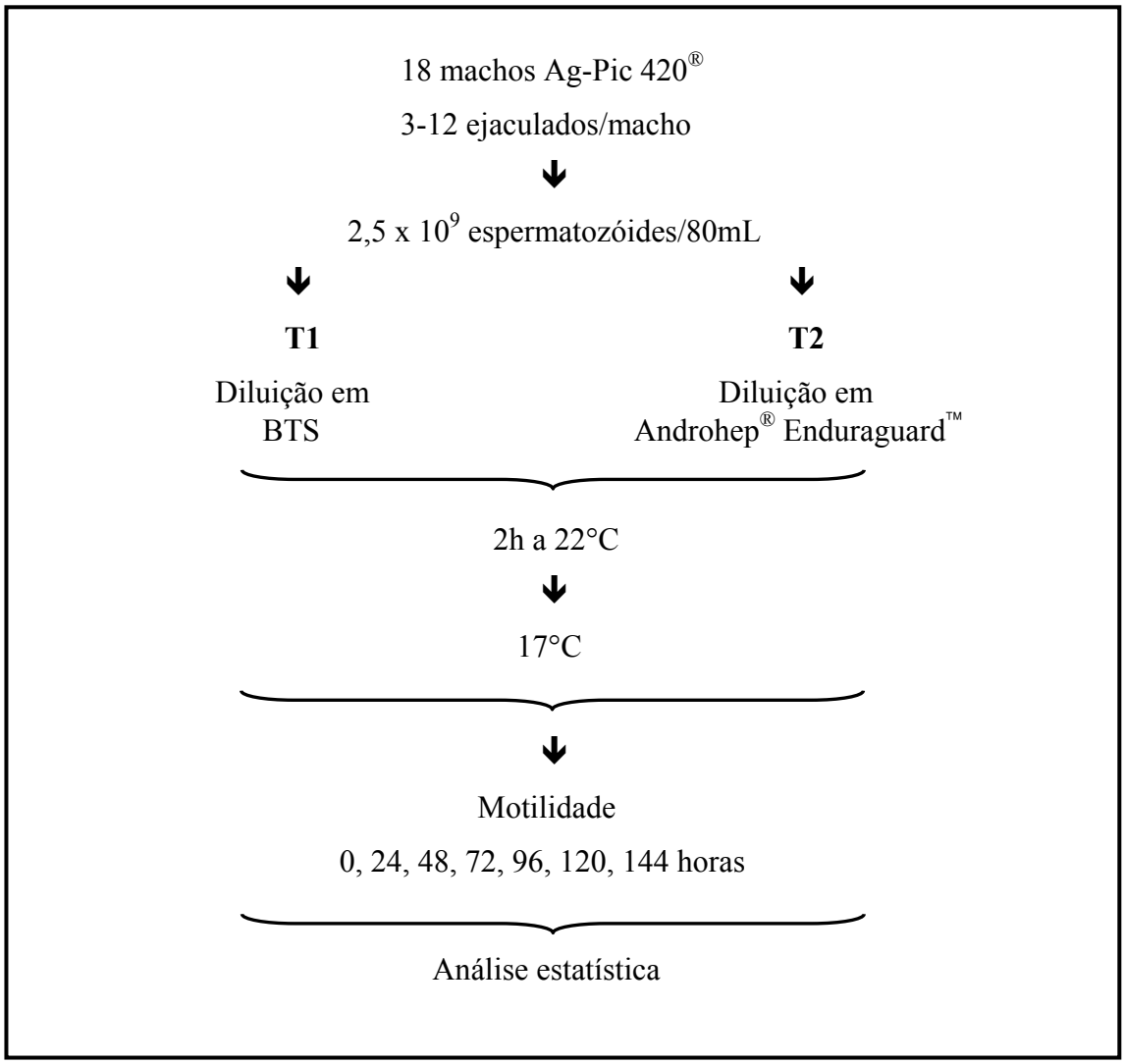

Figura 2: Representação esquemática do experimento II.

3.1.4 Análise estatística

As variáveis submetidas à análise estatística foram os percentuais de Mot (experimentos I e II) e de MI (experimento I). A Mot e MI foram submetidas à análise de variância para medidas repetidas pelo procedimento MIXED (SAS, 1998), sendo considerado o efeito dos tratamentos, da data de coleta, dos machos, do momento de avaliação das amostras e da interação dupla entre esses fatores. Quando um dos fatores ou sua interação não foram significativos, os mesmos foram retirados do modelo

estatístico. No experimento I, foram mantidos no modelo os efeitos do tratamento, do macho, da semana de coleta, da interação tratamento e macho e da interação tratamento e momento, para a variável Mot. Para a variável MI foram mantidos no modelo os fatores tratamento, macho e momento de avaliação. No experimento II, foram mantidos no modelo os fatores tratamento, semana de coleta, macho e momento de avaliação. As médias foram calculadas pela opção LSMeans, sendo comparadas através do teste de Tukey (experimento I) ou teste t (experimento II) com um nível de significância de 5%.

3.2 Experimento III

3.2.1 Local e período de execução

O experimento III foi desenvolvido em uma granja produtora de leitões de uma empresa situada no oeste catarinense com aproximadamente 5.300 matrizes, no período de maio a julho de 2002.

3.2.2 Animais

Foram inseminadas 882 fêmeas híbridas da linhagem Ag-Pic Camborough 22® com ordem de parto entre um e oito e 18 machos híbridos da linhagem Ag-Pic 420® como doadores de sêmen, com idade entre 12 e 40 meses.

3.2.3 Procedimentos experimentais

3.2.3.1 Seleção e classificação das fêmeas

Antes da distribuição nos tratamentos, as matrizes sofreram uma pré-seleção durante a qual foi observado se existia alguma patologia do sistema locomotor ou reprodutivo e também o estado nutricional, determinado pelo escore de condição corporal visual (ECV), que devia ser, no mínimo 2,0, em uma escala de um a cinco. Matrizes que retornaram ao estro após IA não foram utilizadas. As fêmeas selecionadas foram agrupadas em pares, conforme ordem de parto (OP), média de nascidos totais nos partos anteriores (NTPA), duração da lactação (DL) e intervalo desmame-estro (IDE), como demonstrado na Tabela 3, para permitir uma distribuição uniforme das mesmas, entre os tratamentos.

Tabela 3 – Categorias utilizadas para a distribuição das fêmeas nos tratamentos.

Parâmetros de classificação	Categorias
Ordem de parto	1 2 e 3 4 a 8
Média de leitões nascidos totais nos partos anteriores	<10 10-13 >13
Intervalo desmame-estro	1 a 6 dias
Duração da lactação	12 a 26 dias

3.2.3.2 Detecção do estro

As fêmeas desmamadas foram transferidas para o setor de cobertura e alojadas em celas individuais. O diagnóstico de estro foi realizado duas vezes ao dia, às 8:00 e 16:00h, com um macho sexualmente maduro. O início do estro foi considerado o turno em que a fêmea apresentou reflexo de tolerância ao homem na presença do macho (RTM).

3.2.3.3 Tratamentos

As matrizes foram inseminadas com doses inseminantes (DIs) contendo 2,5 bilhões de espermatozóides em um volume total de 80mL. Estas DIs foram armazenadas por, no máximo, até 48h, tendo sido remetidas para a granja em caixas isotérmicas logo após sua produção. As DIs haviam sido produzidas a partir dos mesmos tratamentos utilizados no experimento II.

- Tratamento 1 (T1): IA com sêmen diluído em BTS (*Beltsville Thawing Solution*)
- Tratamento 2 (T2): IA com sêmen diluído em Androhep® Enduraguard™

3.2.3.4 Processamento das doses inseminantes

As DIs utilizadas foram produzidas conforme descrito no capítulo 3.1.2.2.

3.2.3.5 Inseminação artificial (IA)

O protocolo de IA foi o mesmo utilizado pela granja. A primeira inseminação foi realizada no turno seguinte ao início do estro, sendo as IAs subseqüentes realizadas com

intervalos de 24h, enquanto a fêmea apresentasse o RTM. Em cada inseminação, uma das fêmeas de cada par recebeu uma dose diluída em BTS e a outra fêmea uma dose diluída em Androhep® Enduraguard™, sendo ambas as doses produzidas a partir do mesmo ejaculado. As IAs foram realizadas pelos funcionários do setor de cobertura e gestação da unidade, com a presença de um macho sexualmente maduro colocado na frente das fêmeas, durante o procedimento da inseminação.

3.2.4 Coleta dos dados de produtividade

Os dados referentes ao número de leitões nascidos vivos (NV), número de leitões natimortos (NM), número de leitões mumificados (MM), número de leitões nascidos totais (NT), taxa de retorno ao estro (TRE), taxa de parto (TP) e taxa de parto ajustada (TPA) foram obtidos a partir dos relatórios de parto da granja. Os dados de retorno ao estro foram obtidos pelo diagnóstico de retorno ao estro na presença de um macho sexualmente maduro, durante o período de gestação.

3.2.5 Delineamento experimental e análise estatística

O experimento foi executado com um delineamento inteiramente casualizado. As unidades experimentais foram as fêmeas.

Os dados de número de leitões nascidos vivos (NV), leitões natimortos (NM), leitões mumificados (MM) e leitões nascidos totais (NT) foram submetidos à analise de variância pelo procedimento GLM do SAS (1998). Além do efeito dos tratamentos, foi avaliado também o efeito da ordem de parto (OP), da média de nascidos totais nos partos anteriores (NTPA), da duração da lactação (DL) e do intervalo desmame-estro (IDE), os quais permaneceram no modelo, quando significativos. A NTPA foi mantida como covariável na análise de NT, NV e NM. A OP foi utilizada como covariável na análise de NT e NM. As médias foram calculadas pela opção LSMeans, sendo comparadas através do teste t com um nível de significância de 5%.

As taxas de retorno ao estro (TRE), de parto (TP) e de parto ajustadas (TPA) foram comparadas pelo teste do Qui-quadrado, com um nível de 5% de significância.

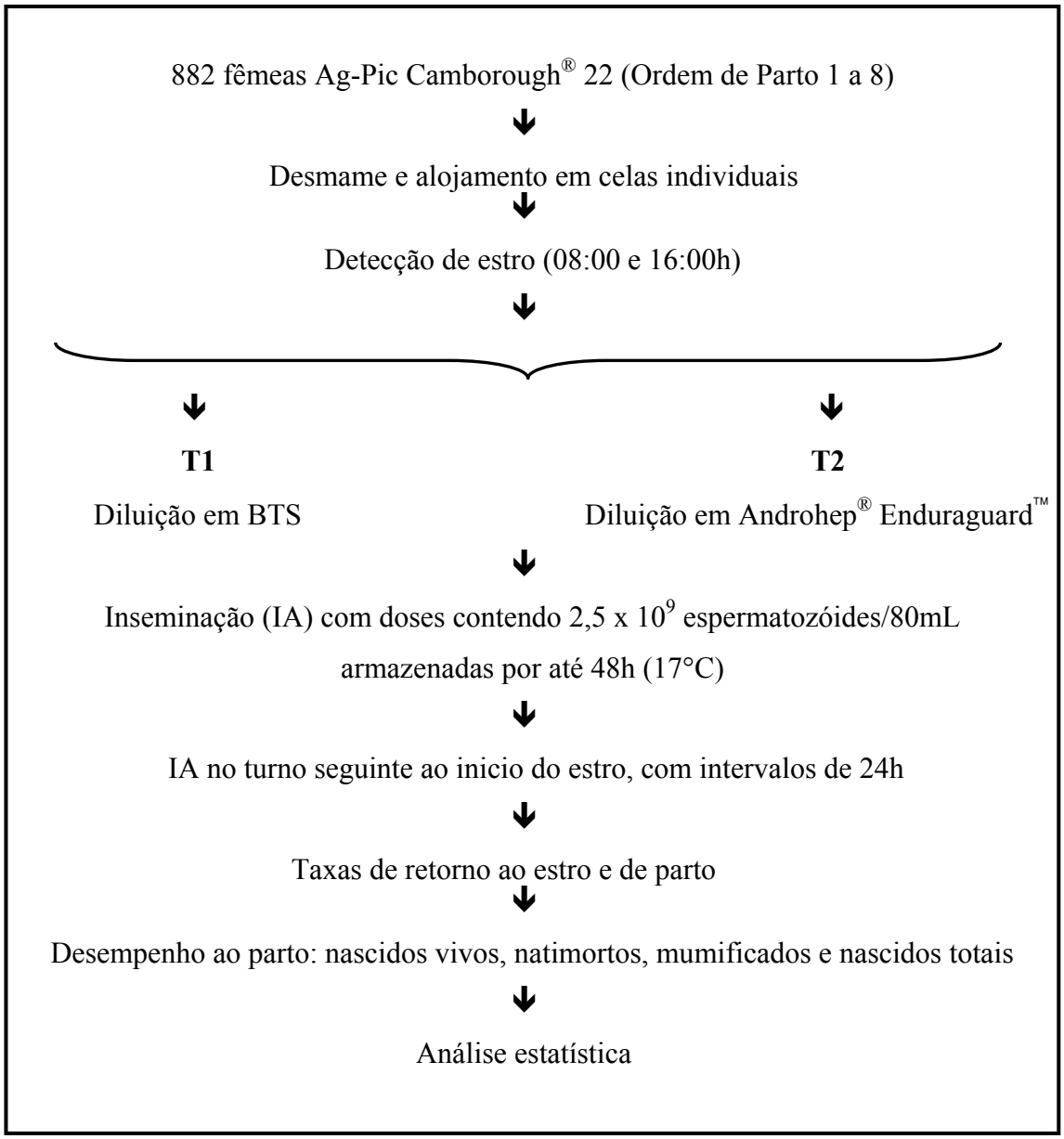

Figura 3: Representação esquemática do experimento III.

4 RESULTADOS

4.1 Experimento I

Houve interação (P<0,05) entre os tratamentos e o momento de avaliação do sêmen, para a variável motilidade espermática. Os percentuais de motilidade foram superiores (P<0,05), das 48 até 144h de armazenamento, para o sêmen diluído em Androhep® Enduraguard™ e Androhep®, em comparação ao BTS (Tabela 4). No último dia de armazenamento (144h), o valor da motilidade do sêmen diluído em Androhep® foi superior (P<0,05) à do sêmen diluído em Androhep® Enduraguard™.

Tabela 4 – Percentuais de motilidade (média ± desvio-padrão) de sêmen suíno diluído em BTS, Androhep® Enduraguard™ (And End) e Androhep® (And), conforme o momento de avaliação.

Momento de avaliação (h)	Tratamentos					
	T1 – BTS	n	T2 – And End	n	T3 – And	n
0	85,63 ± 10,56	24	85,83 ± 7,61	24	91,58 ± 4,43	19
24	76,46 ± 16,52	24	85,63 ± 8,64	24	90,00 ± 4,08	19
48	67,92 ± 24,71[a]	24	85,42 ± 8,84[b]	24	90,26 ± 4,56[b]	19
72	61,67 ± 30,85[a]	24	85,83 ± 11,48[b]	24	88,42 ± 6,47[b]	19
96	57,30 ± 33,75[a]	24	82,08 ± 11,41[b]	24	88,42 ± 11,06[b]	19
120	42,30 ± 33,36[a]	24	74,38 ± 23,47[b]	24	84,47 ± 12,57[b]	19
144	32,30 ± 34,48[a]	24	66,25 ± 27,32[b]	24	82,89 ± 14,37[c]	19
Médias	60,51 ± 26,32	-	80,77 ± 14,11	-	88,00 ± 8,22	-

a, b, c na mesma linha (P<0,05).

Quanto à integridade de membranas (IM), não houve interação entre os tratamentos e o momento de avaliação (P>0,05). Foi observado que os percentuais médios para o sêmen diluído em BTS e Androhep® foram mais elevados (P<0,05) que os observados com o Androhep® Enduraguard™ (Tabela 5).

Tabela 5 – Percentuais de membranas íntegras (média ± desvio-padrão) de sêmen suíno diluído em BTS, Androhep® Enduraguard™ (And End) e Androhep® (And), conforme o momento de avaliação.

Momento de avaliação (h)	Tratamentos					
	T1 – BTS	n	T2 – And End	n	T3 – And	n
48	91,31 ± 4,07	24	88,17 ± 6,62	24	90,71 ± 4,63	19
96	88,69 ± 5,82	24	86,21 ± 7,06	24	88,45 ± 5,26	19
144	88,17 ± 7,40	24	83,48 ± 7,49	24	88,76 ± 4,53	19
Médias	89,39 ± 5,76[a]	-	85,95 ± 7,06[b]	-	89,31 ± 4,81[a]	-

a, b, na mesma linha (P<0,05).

4.2 Experimento II

Não houve diferença (P>0,05) na motilidade espermática entre os diluentes BTS e Androhep® Enduraguard™ em nenhum momento de avaliação (Tabela 6).

Tabela 6 – Percentuais de motilidade (média ± desvio-padrão) de sêmen suíno diluído em BTS e Androhep® Enduraguard™ (And End) conforme o momento de avaliação.

Momento de avaliação (h)	Tratamentos			
	T1 – BTS	n	T2 – And End	n
0	90,28 ± 4,46	125	89,84 ± 5,39	125
24	84,70 ± 7,40	118	84,83 ± 12,30	119
48	84,50 ± 6,54	111	85,13 ± 7,75	112
72	82,08 ± 9,78	96	82,32 ± 13,62	97
96	80,82 ± 13,01	92	83,01 ± 12,66	93
120	81,05 ± 10,74	86	82,18 ± 10,96	87
144	78,06 ± 14,72	80	78,33 ± 16,05	81
Médias	83,07 ± 9,52	-	83,66 ± 11,25	-

P>0,05

4.3 Experimento III

Das 882 fêmeas inseminadas, dados de 18 fêmeas foram perdidos. Assim, para análise dos dados de ordem de parto (OP), média dos nascidos totais nos partos anteriores (NTPA), intervalo desmame-estro (IDE), duração da lactação (DL), número de inseminações artificiais (NIA), taxas de retorno ao estro (TRE) e de parto (TP) foram

considerados 864 animais. Para os valores de duração da gestação (DG), taxa de parto ajustada (TPA), nascidos totais (NT), nascidos vivos (NV), natimortos (NM) e mumificados (MM) foram utilizados dados de 766 animais.

4.3.1 Perfil do rebanho

Tabela 7 – Perfil do rebanho (média ± desvio-padrão) segundo a ordem de parto (OP), a média dos nascidos totais nos partos anteriores (NTPA), o intervalo desmame-estro (IDE) e a duração da lactação (DL) conforme distribuição nos tratamentos.

Categoria	T1 – BTS	T2 – And End	Geral
OP (partos)	3,62 ± 1,88	3,60 ± 1,88	3,61 ± 1,88
NTPA (leitões)	11,48 ± 1,94	11,46 ± 2,06	11,47 ± 2,00
IDE (dias)	4,12 ± 0,82	4,07 ± 0,80	4,09 ± 0,82
DL (dias)	20,95 ± 1,72	20,82 ± 1,91	20,88 ± 1,82

P>0,05

Os valores de BTS e Androhep® Enduraguard™, respectivamente, para o número de inseminações artificiais (NIA) foi de 2,30 e 2,32; intervalo médio (dias) entre a inseminação e o retorno ao estro de 32,67 e 32,79 e duração da gestação (DG) 114,50 e 114,51 dias. As doses de sêmen foram armazenadas até 48h, com período médio de 16,6 horas.

As taxas de retorno ao estro (TRE), de parto (TP) e de parto ajustada (TPA) foram semelhantes (P>0,05) para as fêmeas inseminadas com doses de sêmen armazenadas em BTS e Androhep® Enduraguard™ (Tabela 8).

Tabela 8 – Taxas de retorno ao estro (TRE), de parto (TP) e de parto ajustada (TPA) conforme os tratamentos.

Itens	T1 – BTS		T2 – And End		Geral
	%	n	%	n	
TRE	6,96	30	8,78	38	7,87
TP	90,02	388	87,30	378	88,66
TPA	92,82	388	90,87	378	91,85

P>0,05

Os dados de desempenho reprodutivo ao parto são apresentados na Tabela 9.

Não houve diferença (P>0,05) entre os tratamentos para o número de leitões nascidos vivos (NV), natimortos (NM), mumificados (MM) e número total de leitões nascidos (NT).

Tabela 9 – Média ± desvio-padrão do número de leitões nascidos vivos (NV), natimortos (NM), mumificados (MM) e nascidos totais (NT) de fêmeas inseminadas com BTS ou com Androhep® Enduraguard™ (And End).

Tratamentos	n	NV	NM	MM	NT
T1 – BTS	388	10,83 ± 2,77	0,80 ± 1,13	0,17 ± 0,47	11,80 ± 2,98
T2 – And End	378	10,79 ± 2,90	0,84 ± 1,07	0,17 ± 0,48	11,80 ± 3,09

P>0,05

5 DISCUSSÃO

5.1 Qualidade espermática *in vitro*

Os valores de motilidade observados no experimento I, para o sêmen diluído em Androhep® e Androhep® Enduraguard™, armazenado a 17ºC, se situam dentro das variações observadas nos demais trabalhos realizados na área. No entanto, a motilidade do sêmen diluído em BTS, no experimento I, esteve abaixo dos valores relatados por outros autores. Com armazenamento de 120h, vários autores (SATHER, HARBISON & SETH, 1991; LIETMANN, 1992; BALTES, 1993; SCHEID et al., 1993; WABERSKI et al., 1994; PAULENZ, KOMMISRUD & HOFMO, 2000; REIS et al., 2000) observaram percentuais de motilidade iguais ou acima de 60%, e Lübbert zur Lage (1991) observou 77% de motilidade, nas 144h de armazenamento. No experimento I, a motilidade do sêmen era de 86% após a diluição em BTS e caiu para 42,3 e 32,3% nas 120 e 144h de armazenamento, respectivamente. Esses dados contrastam com os resultados obtidos em quatro experimentos, efetuados recentemente (KATZER, 2002), no mesmo laboratório em que foi realizado o experimento I. Nesses experimentos, o armazenamento do sêmen em BTS resultou em valores de motilidade que variaram de 65 a 82% e de 59 a 76%, nas 96 e 120h de armazenamento, respectivamente.

No experimento I, os valores de motilidade do sêmen diluído em Androhep® foram estatisticamente superiores ($P<0,05$), a partir das 48h de armazenamento, quando comparados ao BTS, contrastando com observações de outros autores. Lietmann (1992) não observou diferença significativa na motilidade para sêmen diluído em BTS e Androhep®, nas 120h de armazenamento. Lübbert zur Lage (1991) observou 77 e 79% de motilidade para o sêmen armazenado em BTS e Androhep®, respectivamente, nas 144h. Baltes (1993) observou percentuais de 76 e 80% de motilidade, respectivamente, para sêmen diluído em BTS e Androhep®, armazenado por 120h. Waberski et al. (1994) compararam o armazenamento de sêmen processado em BTS e Androhep®, durante 120h de armazenamento, e observaram valores de motilidade de 62 e 73%, respectivamente, nas 120h. Althouse (1997) comparou os diluentes BTS e Androhep®, durante um período de 120h de armazenamento do sêmen a 17°C, e não observou

diferença significativa (P>0,05) entre os diluentes quanto à motilidade (62 e 73%, respectivamente). Ao verificar a influência do diluente sobre a motilidade do sêmen suíno resfriado a 17°C, Bandeira-Kotzias (1999) constatou percentuais de motilidade semelhantes (P>0,05) entre BTS e Androhep®, após 48h de armazenamento (70 e 75%, respectivamente).

Embora os valores de motilidade tenham sido baixos para o sêmen diluído em BTS, no experimento I, o percentual de membranas íntegras não foi afetado. Inclusive, os valores médios de MI para os diluentes BTS e Androhep® foram semelhantes entre si e superiores aos observados com o armazenamento em Androhep® Enduraguard™. A diferença de 3,4% de MI é um valor que não deve, no entanto, ser considerado biologicamente relevante porque o número de espermatozóides utilizados por dose, na inseminação convencional, é relativamente alto (3 bilhões) em relação ao número de espermatozóides necessários para fecundação. Pode-se especular que, se o valor de integridade de membrana estivesse próximo do limite que afeta os índices de desempenho, esta pequena diferença poderia, eventualmente, trazer algum prejuízo, caso o número de espermatozóides para a inseminação fosse reduzido.

No experimento I, chama a atenção o fato do sêmen diluído em BTS ter apresentado elevado percentual de espermatozóides com membranas íntegras (88%), nas 144h de armazenamento, contrastando com baixo percentual de motilidade (32%), no mesmo momento de avaliação. Se apenas o parâmetro membranas íntegras tivesse sido utilizado, os três diluentes avaliados no experimento I teriam sido considerados semelhantes. No entanto, segundo Juonala et al. (1999), a avaliação da motilidade não pode ser inteiramente substituída pela avaliação da integridade de membrana. Sêmen armazenado em diluente inadequado pode apresentar bons resultados nas colorações fluorescentes mesmo que os espermatozóides estejam imóveis. Esta condição já foi observada em doses de sêmen com osmolaridade muito alta ou contendo muitas bactérias.

Não se sabe qual a causa da queda de motilidade do sêmen armazenado em BTS observada no experimento I. Isso poderia ter sido oriundo da qualidade da água utilizada na diluição. Apesar dessa água ter passado pelo processo de destilação e deionização, não foi realizado exame bacteriológico prévio ao experimento *in vitro* para determinação da sua contaminação bacteriana. No entanto, o sêmen armazenado em BTS apresentou maior desvio-padrão nos seus percentuais de motilidade, em comparação ao armazenado nos outros dois diluentes (Tabela 4), devido ao fato de que

o sêmen de alguns machos, em algumas semanas, apresentou diminuição acentuada da motilidade, quando armazenado em BTS. As doses de sêmen não foram submetidas a exame bacteriológico ou a controle de pH, durante o armazenamento, mas é provável que, apesar dos cuidados efetuados na coleta e processamento do sêmen, tenha havido maior contaminação em alguns ejaculados de alguns machos. Bennemann (1998) observou uma rápida queda da qualidade espermática do sêmen coletado, em quatro das cinco centrais de inseminação estudadas, atribuindo o fato à possibilidade de contaminação do sêmen durante a coleta e/ou processamento. Segundo Dias et al. (2000), a realização de uma higienização pré-coleta satisfatória e a correta fixação do pênis no momento da coleta reduzem a contaminação bacteriana e, conseqüentemente, permitem uma maior viabilidade do sêmen, uma vez que, no decorrer do período de armazenamento, o aumento das populações microbianas pode levar ao acúmulo de toxinas e metabólitos que podem afetar a sobrevivência e a capacidade fecundante dos espermatozóides.

Como os diluentes utilizados no experimento I possuem tampões diferentes, a contaminação oriunda da coleta ou outras fontes poderia ter determinado uma variação de pH, capaz de ser tamponada nos diluentes Androhep® e Androhep® Enduraguard™, mas não no BTS. Além disso, os antimicrobianos usados eram diferentes, sendo a neomicina no BTS e a gentamicina para os outros dois diluentes. Pode-se cogitar que o efeito deletério direto das bactérias e/ou da mudança de pH do meio provocada pelas mesmas, não teria sido controlado no BTS.

Sabe-se que os antibacterianos possuem diferente espectro de ação e, mesmo sendo usados para o controle do crescimento bacteriano, eles podem apresentar efeito prejudicial sobre a viabilidade espermática (POOLPEM, FLOWERS & ALMOND, 1998; REIS et al., 1999). Poolpem, Flowers & Almond (1998) observaram que a gentamicina e a neomicina apresentaram eficácia semelhante na manutenção da motilidade espermática ao longo de sete dias de armazenamento, tendo efeito superior ao da combinação penicilina e estreptomicina. Embora a integridade de acrossoma não tenha sido afetada, a presença de gentamicina no diluente BTS acarretou diminuição da motilidade do sêmen armazenado por 96h em comparação ao sêmen sem antimicrobianos. Segundo Althouse et al. (2000), se o antimicrobiano for ineficaz no controle do crescimento de bactérias contaminantes, o diluente torna-se um meio de cultivo adequado para estes microorganismos. Após constatação da diminuição drástica da viabilidade espermática, aproximadamente em 48h de armazenamento, aumento de

retornos ao estro e/ou de descargas vulvares, Althouse et al. (2000) investigaram a qualidade seminal de 23 propriedades suinícolas que apresentavam estes problemas. Os autores constataram pH ácido (5,7 a 6,4) em 93% das amostras avaliadas. Embora 12 gêneros bacterianos isolados das amostras de sêmen resultassem em queda de pH do diluente, eles observaram efeito espermicida tanto das bactérias que provocavam redução de pH como daquelas que não alteravam o pH do meio. Surpreendentemente, boa parte das bactérias isoladas do sêmen eram resistentes a vários antimicrobianos testados, sendo todas resistentes à gentamicina, uns dos antimicrobianos mais comumente utilizados nos diluentes de sêmen suíno.

O conjunto de informações mostra que a presença de antimicrobianos nem sempre pode evitar o crescimento bacteriano. Dessa forma, é possível que a neomicina tenha sido menos eficaz que a gentamicina em controlar a microbiota específica dos ejaculados de alguns machos, no experimento I.

No experimento II, a gentamicina foi o antimicrobiano utilizado nos dois diluentes, e valores elevados de motilidade (78%) foram observados nas 144h tanto para o armazenamento em BTS como em Androhep® Enduraguard™. Valor semelhante (77%) foi observado para o BTS, por Lübbert zur Lage (1991), com o mesmo tempo de armazenamento. Em dados publicados em Sperm notes (2002), o sêmen diluído em Androhep® Enduraguard™ apresentou motilidade de 80% nas 120h de armazenamento, semelhante ao valor de 82% observado no presente estudo.

5.2 Desempenho reprodutivo

Ao inseminar as fêmeas com sêmen armazenado a 17ºC por até 48h, no experimento III, os diluentes Androhep® Enduraguard™ e BTS foram semelhantes quanto ao desempenho reprodutivo (taxa de retorno ao estro, taxa de parto, taxa de parto ajustada, número de leitões nascidos totais, nascidos vivos, natimortos e mumificados). Laforest & Allard (1996) compararam os diluentes BTS, MR-A®, Modena e Androhep® ao longo de 168h de armazenamento e concluíram que o BTS é tão eficiente quanto os diluentes mais complexos. A taxa de prenhez dos quatro diluentes nas 96h variou de 83 a 89%, sem diferença significativa entre eles. Quanto ao tamanho da leitegada, esses autores observaram valores semelhantes para BTS e Androhep® (11,4 e 11,6 leitões, respectivamente).

Os valores de taxa de parto das fêmeas inseminadas com Androhep® Enduraguard™ e BTS foram de 87,3 e 90%, respectivamente, não havendo diferença

significativa entre eles (P>0,05). Lübbert zur Lage (1991) verificou que, ao inseminar fêmeas com sêmen armazenado até 24h, a 15ºC, não houve diferença significativa sobre a taxa de fecundação entre os diluentes BTS e Androhep®. Lietmann (1992), ao comparar a capacidade de fecundação das doses de sêmen diluídas em BTS e Androhep®, observou uma queda significativa na taxa de fecundação, com o uso de sêmen armazenado por 48h, em BTS, o que não ocorreu no presente estudo. Em trabalho realizado por Waberski et al. (1994), no qual foram comparados BTS e Androhep®, as taxas de fecundação para o sêmen armazenado por 48h foram semelhantes (P>0,05) para Androhep® (79%) e BTS (68%).

Blichfeldt, Almlik & Stavne (1988) estudaram o desempenho reprodutivo de fêmeas inseminadas com doses de sêmen contendo $2x10^9$ espermatozóides, diluídos em BTS e Kiev, armazenados entre 15 e 20^oC, em diferentes períodos (0-24, 24-48 e 48-72h). Houve uma diminuição na taxa de parto de 10% com os dois diluentes, quando utilizados com três dias de armazenamento. No entanto, o BTS foi superior quanto ao tamanho de leitegada, apresentando 0,5 leitão a mais.

Embora o desempenho reprodutivo após inseminação tenha sido semelhante para os dois diluentes, no experimento III, quando o sêmen foi armazenado por até 48h, o fato do BTS ser considerado um diluente de curta e o Androhep® Enduraguard™ de longa manutenção da viabilidade espermática, mais estudos *in vivo* devem ser efetuados para confirmar ou não este aspecto, sobretudo com períodos mais longos de armazenamento.

6 CONCLUSÕES

Nas condições em que foi desenvolvido este experimento é possível concluir que:

- Os percentuais de motilidade estiveram acima de 60%, parâmetro aceitável para a inseminação artificial, até 144h de armazenamento do sêmen diluído em Androhep® Enduraguard™ e Androhep® (experimento I) e Androhep® Enduraguard™ (experimento II).
- Quando diluído em BTS, a motilidade do sêmen esteve acima do padrão aceitável para inseminação artificial, durante 144h de armazenamento, no experimento II, mas abaixo desse, a partir de 96h, no experimento I.
- A motilidade do sêmen diluído em BTS foi inferior à observada com os diluentes Androhep® Enduraguard™ e Androhep®, no experimento I, mas foi semelhante à do sêmen armazenado em Androhep® Enduraguard™, no experimento II.
- A integridade de membranas não foi afetada pelo diluente utilizado, no experimento I (BTS, Androhep® Enduraguard™ e Androhep®), tendo sido superior a 83% até 144h de armazenamento do sêmen.
- O desempenho reprodutivo (taxa de retorno ao estro, taxa de parto, taxa de parto ajustada, número de leitões nascidos totais, nascidos vivos, natimortos e mumificados) das fêmeas inseminadas com sêmen armazenado até 48h, não foram afetados pelo diluente de sêmen utilizado (BTS ou Androhep® Enduraguard™), no experimento III.

REFERÊNCIAS

ALTHOUSE, G.C. Comparison of currently used semen extenders in the swine industry. **The Compendium**, p.777-782. 1997.

ALTHOUSE, G.C.; 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.

ALTHOUSE, G.C.; KUSTER, C.E.; CLARK, S.G.; WEISIGER, R.M. Field investigations of bacterial contaminants and their effects on extended porcine semen. **Theriogenology**, v.53, p.1167-1176, 2000.

BALTES, T.J. Plasma membrane evaluation with fluorescent stains, and computer-measured motility as indicators of *in vitro* aging of boar spematozoa. **Tese de Doutorado**. Escola Superior de Hannover, Alemanha, 102p. 1993.

BAMBA, K.; CRAN, D.G. Effects of treatment with butylated hydroxytoluene on the susceptibility of boar spermatozoa to cold stress and dilution. **Joumal of Reproduction and Fertility**, v.95, p.69-77. 1992.

BANDEIRA-KOTZIAS, E. Influência de diferentes diluentes e temperaturas de refrigeração sobre a qualidade de sêmen suíno. **Brazilian Journal of Veterinary Research in Animal Science**, v.36, n.4. 1999.

BENNEMANN, P.E. 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. **Dissertação de Mestrado**. Faculdade de Veterinária da UFRGS, Porto Alegre, Brasil, 256p. 1998.

BLICHFELDT, T.; ALMLIK, T.; STAVNE, S.E. Liquid preservation of boar semen in Kiev or BTS, a field comparison. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION. 11. Paris, France. **Proceedings…** Paris, p.231-233. 1988.

BORTOLOZZO, F.P.; LÜBBERT ZUR LAGE, W.; WABERSKY, D.; WILLMEN, T.; WEITZE, K.F. Armazenamento da dose de sêmen *in vitro* por 1, 2 e 3 dias e seus efeitos sobre a taxa de fertilização e número de espermatozóides acessórios após a inseminação artificial em suínos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS. 6., 1993, Goiânia-GO. **Anais...** Goiânia, p.120. 1993.

BUHR, M.M.; PETTITT, M.J. Frozen-thawed boar sperm: isolation of membranes and fluidity measurement. **Reproduction in Domestic Animals**, v.31, n.1, p.147-152. 1996.

DE LEEUW, F.E.; COLENBRANDER, B.; VERKLEIJ, A.J. The role membrane damage plays in cold shock and freezing injury. **Reproduction in Domestic Animals**, Suppl.1, p.95–104. 1991.

DESCHAMPS, J.C.; LUCIA, T.; TALAMINI, D.J.D. A cadeia produtiva da suinocultura. In: LUCIA, T.; CORRÊA, M.N.; DESCHAMPS, J.C. **Tópicos em suinocultura**. JH Barbacha: Pelotas-RS. p.11-35. 2000.

DIAS, C.P.; CASTAGNA, C.D.; REIS, G.R.; SIMONETTI, R.; BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, IVO; CARDOSO, M. Grau de contaminação bacteriana no ejaculado de suínos submetidos a dois métodos de higienização e coleta. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v.28, n.1, p.32-40. 2000.

HANCOCK, J.L.; HOVELL, G.J.R. Insemination before and after the onset of heat in sows. **Veterinary Record**, v.71, p.664-665. 1959.

HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Joumal of Reproduction and Fertility**., v.88, p.343-352. 1990.

HOFMO, P.O. Commercial swine AI with liquid semen in Norway. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BOAR SEMEN PRESERVATION. 2., 1991, Beltsville, Maryland USA. **Proceedings…** Beltsville, p.317-324. 1991.

HOFMO, P.O.; KOMMISRUD, E.; SCHESTED, E. A field comparing the fertility of fresh boar semen stored in BTS for 2-3 days and MR-A® for 4-5 days. In: CONGRESS INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY. 15th, 1998, Birmingham, England, **Proceedings...** Birmingham, v.3, p.64. 1998.

HUINKER, C.D. Effect of boar sêmen age on fertility. In: CONGRESS INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY. 15th., 1998, Birmingham, England, **Proceedings...** Birmingham, v.2, p.240. 1998.

HUO, LI-JUN.; MA, XING-HONG.; YANG, ZENG-MING. Assessment of sperm viability, mitochondrial activity, capacitation and acrosome intacteness in extended boar semen during long-term storage. **Theriogenology**, v.58, p.1349-1360. 2002.

JOHNSON, L.A. Current developments in swine semen: preservation, artificial insemination and sperm sexing. In: CONGRESS INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY. 15th., 1998, Birmingham, England, **Proceedings...** Birmingham, v.1, p.225-229. 1998.

JOHNSON, L.A.; ALBERS, J.G.; WILLEMS, C.M.T.; RADEMAKER, J.H.M. Fertility of boar semen stored in BL-1 and Kiev extenders at 18ºC for three days. In: CONGRESS INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY. 5th, 1980, Copenhagen, Denmark, **Proceedings...** Copenhagen, p.33. 1980.

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

JUONALA, T.; SALOMEN, E.; NURTTILA, T.; ANDERSSON, M. Three fluorescent methods for assessing boar sperm viability. **Reproduction in Domestic Animals**, v.34, p.83-87. 1999.

KATZER, L.H. Resfriamento de sêmen suíno: efeito da temperatura de armazenamento, incubação prévia, taxa de resfriamento e diluentes. **Dissertação de Mestrado**. Faculdade de Veterinária da UFRGS, Porto Alegre, Brasil, 70p. 2002.

KATZER, L.H.; BERNARDI, M.L.; SILVA, L.E.; SCHWARZ, P.; CARDOSO, M.; BORTOLOZZO, F.P.; PADILHA, A.P.; WENTZ, IVO. Comportamento de populações bacterianas presentes no sêmen suíno resfriado em diferentes temperaturas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS. 10., 2001, Porto Alegre-RS. **Anais...** Porto Alegre, v.2, p.247-248.2001.

KORNIEWICZ, D.; SZCZESNIAK-FABIANCZYK, B.; SMORAG, Z. The survival rate and fertilizing capacity of boar semen diluted with different diluents. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BOAR SEMEN PRESERVATION. 3., 1996, Mariensee, Germany. **Proceedings…** Mariensee, p.273-274. 1996.

KUIPER, C.J.; HAAS, A.J. DE. Some aspects of artificial insemination in industrial breeding and production program. In: CONGRESS INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY. 5th, 1980, Copenhagen, Denmark, **Proceedings...** Copenhagen, p.36. 1980.

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, p.365-376. 1999.

LAFOREST, J.P.; ALLARD, D. Comparison of four extenders for long-term storage of fresh boar semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v.31, p.275-276. 1996.

LANDSVERK, K. Packaging and distribution – their impact on fertility. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BOAR SEMEN PRESERVATION. 4., 2000, Beltsville, Maryland USA. **Proceedings…** Beltsville, p.137-139, 2000.

LEVIS, D. Liquid boar semen production: current extender technology and where do we go from here! In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BOAR SEMEN PRESERVATION. 4., 2000, Beltsville, Maryland USA. **Proceedings…** Beltsville, p.121-128, 2000.

LIETMANN, C. *EinfluB des Spermienalters auf Befruchtungsrate und Spermientransport bei postovulatorischer Frischspermabesamung de Jungsau*. **Tese de Doutorado**. Escola Superior de Hannover, Alemanha, 91p. 1992.

LÜBBERT ZUR LAGE, W. *EinfluB des Spermienalters auf Brefruchtungsrate und akzessorische Spermienzahl unter Berücksichtingung des Ovulationszeitpunktes bei der Frischspermabesamung des Schweines*. **Tese de Doutorado**, Escola Superior de Hannover, Alemanha, 103p.1991.

LYCZYNSKI, A.; KOLAT, K. Boar semen preservation in MR-A® diluent. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BOAR SEMEN PRESERVATION. 3., 1996, Mariensee, Germany. **Proceedings…** Mariensee, p.271-272. 1996.

LYCZYNSKI, A.; SOCZYWKO, S.; MARTÍN-RILLO, S.; ALBA-ROMERO, C. DE. Comparsion of insemination results for sows inseminated with semen stored for 4 days in 3 different diluents. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BOAR SEMEN PRESERVATION. 4., 2000, Beltsville, Maryland USA. **Proceedings…** Beltsville, p.250. 2000.

MAXWELL, W.M.C.; JOHNSON, L.A. Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. **Theriogenology**, v.48, p.209-219. 1997.

OHATA, P.M. A influência do período de equilíbrio, do plasma seminal e da sensibilidade dos machos ao resfriamento na congelabilidade do sêmen suíno. **Dissertação de Mestrado**. Faculdade de Veterinária da UFRGS, Porto Alegre, Brasil, 81p. 2001.

ORTMAN, K.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Membrane damage during dilution, cooling and freezing-thawing of boar spermatozoa packaged in plastic bags. **Journal of Veterinary Medicine**, v.41, p.37-47.1994.

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.

POOLPEM, P.; FLOWERS, W.L.; ALMOND, G.W. Evaluation antibiotics in boar semen extender. In: CONGRESS INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY. 15th., 1998, Birmingham, England, **Proceedings...** Birmingham, v.2, p.36. 1998.

PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A.; RAMPACEK, G.B. Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. **Journal of Animal Science**, v.34, n.2, p.278-283. 1972.

QUINN, J.P. A lipid-phase separation model of low-temperature damage to biological membranes. **Cryobiology**, v.22, p.128-146. 1985.

REED, H.C.B. Commercial requirements for an effective fresh semen diluent. **Reproduction in Domestic Animals**, Suppl.1, p.255-270. 1991.

REIS, G.R.; CASTAGNA, C.D.; DIAS, C.P.; WENTZ, I.; BORTOLOZZO, F.P. Motilidade espermática e integridade de acrossoma de sêmen suíno resfriado com ou sem o uso de gentamicina. CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 9, Belo Horizonte, 26 a 29 outubro, 1999, p. 339. 1999.

REIS, G.R.; OHATA, P.M.; SCHWARZ, P.; BERNARDI, M.L.; CASTAGNA, C.D.; BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, IVO. Identificação de cachaços com diferentes períodos de viabilidade *in vitro*. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL MINITUB "INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM SUÍNOS". 3., 2000, Flores da Cunha-RS. **Anais...**

Flores da Cunha, p.42-49. 2000.

SAS INSTITUTE (Cary NC). **SAS user's guide:** Statistical Analysis System, Release 6.12.1998.

SATHER, A.P.; HARBISON, D.S.; SETH, P.C. A note on the influence of storage duration of fresh semen on fertilizing capacity and embryo survival in sows. **Animal Production**, v.52, p.554-557. 1991.

SCHEID, I.; WENTZ, IVO; BERTANI, G.; BARIONI, Jr.; SCANDOLARA, S. Comparação entre diluentes para conservação de sêmen suíno no estado líquido: resultados *in vitro*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS. 6., 1993, Goiânia-GO. **Anais...** Goiânia, p.122. 1993.

SCHEID, I.R. Commercial swine artificial insemination in Brazil: development and current use. **Reproduction in Domestic Animals**, Suppl. 1, p.299-301. 1991.

SCHEID, I.R. Uma análise da IA na suinocultura brasileira. **Suínos & Cia**, v.1, p.25-28. 2002.

SPERM NOTES: The international AI newslatter from Minitüb. **Androhep® Enduraguard™: boar semen extender gives new perspectives to the AI industry**. n.9, p.1-2. 2002.

TASSERON, F.; AMIR, D.; SCHINDLER, H. Acrosome damage of ram spermatozoa during dilution, cooling and freezing. **Joumal of Reproduction and Fertility**, v.51, p.461–462, 1977.

VAZQUEZ, J.M.; MARTINEZ, E.A.; ROCA, J.; MATA, C.; BLANCO, O. The fertilizing ability assessment of fresh and stored boar semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v.33, p.265-268. 1998.

WABERSKI, D. *In vitro-und Besamungsversuche unter Praxisbedigungen mit langzeitkonserviertem Eberflüssigsperma unter besonderer Berücksichtigung von BSA und Puffer im Verdünnermedium*. **Tese de Doutorado**, Escola Superior de Hannover, Alemanha, 103p.1988.

WABERSKI, D.; WEITZE, K.F.; LIETMANN, C.; LÜBBERT ZUR LAGE, W.; BORTOLOZZO, F.P.; WILLMEN, T.; PETZOLDT, R. The initial fertilizing capacity of long-term-stored liquid boar semen following pre-and postovulatory insemination. **Theriogenology**, v.41, p.1367-1377, 1994.

WEBER, H. *Zur Kälteschockempfindlichkeit von Eberspermien; Einflu von Verdünnermedium, Inkubation und Abkühlrate*. **Tese de Doutorado**. Escola Superior de Hannover, Alemanha, 103p. 1989.

WEITZE, K.F. Long-term storage of extender boar semen. **Reproduction in Domestic Animals**, Suppl.1, p.231-253. 1991.

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

WEITZE, K.F. Update on the worldwide application of swine AI. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BOAR SEMEN PRESERVATION. 4., 2000, Beltsville, Maryland USA. **Proceedings…** Beltsville, p.141-145. 2000.

WENTZ, IVO; VARGAS, A.J.; BORTOLOZZO, F.P.B.; CASTAGNA, C.D. Situação atual da inseminação artificial em suínos no Brasil e viabilização econômica do emprego dessa biotécnica. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL MINITUB "INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM SUÍNOS". 3., 2000, Flores da Cunha-RS. **Anais...** Flores da Cunha, p.5-12. 2000.

WOELDERS, H. Overview of in methods for evaluation of semen quality. **Reproduction in Domestic Animals**, Suppl. 1. p.145-164. 1991.

ANEXOS

ANEXO A – Composição química de alguns diluentes utilizados no resfriamento de sêmen suíno.

Ingredientes (g)	Beltsville L1 (BL1)	Kiev Modificado	Modena	Modena modificado	Beltsville Thawing Solution (BTS)	BW25	Androhep	MR-A
Glicose	2,9	60,0	27,5	25,0	37,0	11,5	26,0	sim
Citrato de sódio	1,0	3,7	6,9	6,9	6,0	15,9	8,0	sim
Bicarbonato de sódio	0,2	1,2	1,0	1,0	1,25	1,2	1,2	sim
EDTA	-	3,7	2,35	2,35	1,25	2,4	2,4	sim
Cloreto de potássio	0,03	-	-	-	0,75	-	-	-
Acetato de potássio	-	-	-	-	-	-	-	sim
Cisteína	-	-	-	-	-	-	-	sim
Ácido cítrico	-	-	2,9	2,0	-	-	-	-
TRIS	-	-	5,65	5,65	-	-	-	-
MOPS	-	-	-	10,5	-	-	sim	-
HEPES	-	-	-	-	-	9,5	sim	-
BSA	-	5,0	-	3,0	-	2,5	2,5	sim
Osmolaridade	isotônico	282	240	282	330	312	309	290
pH	-	6,62	6,9	6,9	7,2	6,6	6,8	6,9

Fonte: Levis (2000).