



PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia.

Congelamento de sêmen suíno e seu uso em nível de granja

Carine Dahl Corcini^{1,2}; Denise Calisto Bongalhardo³; Stela Mari Meneghello Gheller², Valquíria Maria Danieli²; Éder Francisco Maschio²; Denise Zanatta Martini⁴; Ivan Bianchi²; Thomaz Lucia Jr.²

¹Centro de Biotecnologia- UFPel

²PIGPEL- Faculdade de Veterinária – UFPel

³Instituto de Biologia – UFPel

⁴Graduanda em Ciências Biológicas– URI

Resumo

A grande maioria das inseminações artificiais (IA) em suínos realizadas no mundo, utiliza sêmen diluído e acondicionado no estado líquido, a 15-18°C por um período de 1 a 5 dias, sendo 85% realizadas no dia da coleta do sêmen ou no dia seguinte. Entretanto esta temperatura de estocagem limita o transporte além de restringir o tempo de vida útil do sêmen. Assim, a expansão da IA em suínos poderia ser ainda maior, se outras tecnologias de preservação de sêmen suíno fossem desenvolvidas tais como a criopreservação ou congelamento. A IA com sêmen congelado requer duas a três vezes mais espermatozoides por dose, o tamanho da leitegada é diminuído em um a três leitões por parto e a taxa de parição é menor, tornando-o inviável economicamente em comparação ao uso de sêmen acondicionado resfriado na forma líquida. A menor fertilidade e prolificidade do sêmen suíno congelado são devidas principalmente a alterações funcionais e estruturais na célula, especialmente na membrana

plasmática, resultantes do choque térmico e choque osmótico a que o espermatozóide é submetido durante o resfriamento, congelamento e descongelamento. Esta revisão objetivou salientar os fatores envolvidos no processo de congelamento de sêmen suíno, bem como a possibilidade de uso dessa biotécnica em nível de granja associado ao uso de diferentes técnicas de Inseminação Artificial.

Swine sperm freezing and its use in farms

Abstract

The majority of swine artificial inseminations (AI) performed in the world uses semen in the liquid state, diluted and refrigerated at 15-18°C for 1 to 5 days, being 85% of them realized in the day of collection or in the next day. However, this storing temperature limits the transportation, as well as reduces the semen shelf-life. Therefore, the expansion of swine AI could be even better if other technologies for swine sperm preservation, as cryopreservation, were developed. The AI with frozen semen requires two to three times more sperm per doses, litter size is decreased in one to three piglets per parturition, and parturition rate is smaller than AI with refrigerated semen, which turns the procedure economically not viable for use when compared to the traditional technology. The lower fertility and prolificity of frozen swine semen are attributed to functional and structural alterations in the cell, especially in the plasma membrane, resulting from cold and osmotic shock to which the sperm is subjected during cooling, freezing, and thawing. This review aimed to highlight the factors involved in the process of swine semen freezing, as well as the possibility of use of this biotechnology in the farms, associated with different AI techniques.

1. INTRODUÇÃO

O incremento atual do plantel de matrizes da cadeia suinícola, observando exigências de mercado e buscas por melhores desempenhos

reprodutivos, aponta para a necessidade de se obter animais que, através do emprego de novas tecnologias, possam expressar o máximo de seu potencial genético. A inseminação artificial (IA) surgiu como uma biotécnica capaz de melhorar a produtividade e a rentabilidade de granjas de suínos tecnificadas. No entanto, apesar de ser um procedimento simples, se não for conduzido no momento adequado e de forma correta, pode reverter seus benefícios tornando-se um fator limitante nos resultados de produção (Bortolozzo e Wentz, 1995).

Atualmente, no processo de IA é utilizado sêmen resfriado com deposição da dose inseminante na região cervical. Visando a maximização das vantagens observadas na IA, muitos estudos foram realizados e novas técnicas, bem como novas formas de conservação do sêmen, surgiram e estão sendo testados em nível de granja, como no caso da IA intra-uterina, ou permanecem a nível experimental, como no caso da criopreservação de sêmen.

A conservação do sêmen suíno através do congelamento, sem alteração dos resultados de fertilidade, é um dos objetivos da pesquisa na área de reprodução, já que com a disponibilidade de tal técnica ocorreria um grande impulso nos programas de IA por promover um melhoramento animal através da preservação de material de animais geneticamente superiores, além da possibilidade de aumentar a vida útil do sêmen facilitando o transporte a longas distâncias. Essa tecnologia foi revolucionada aproximadamente à cinqüenta anos através com a descoberta do glicerol como crioprotetor (HOLT, 2000). No entanto, o processo de congelamento ocasiona danos celulares irreversíveis devido à mudança de temperatura, formação de cristais de gelo, injúrias oxidativas, alterações na membrana do espermatozóide, lesão no DNA, estresse osmótico, além dos danos ocasionados pela toxicidade dos crioprotetores (BALL & VO, 2001). Isso reduz a proporção de espermatozoides viáveis, bem como a capacidade funcional destes (WATSON, 2000).

Esta revisão objetivou salientar os fatores envolvidos no processo de congelamento de sêmen suíno, bem como a possibilidade de uso dessa

biotécnica em nível de granja associado ao uso de diferentes técnicas de Inseminação Artificial.

2. CONGELAMENTO

A tecnologia de sêmen suíno criopreservado está disponível no mercado desde a década de 70 com o intuito de possibilitar a constituição de uma barreira adicional contra a introdução de doenças infecciosas, além de representar uma alternativa para maximizar o melhoramento de características maternas e de qualidade de carcaça. Porém com a utilização do sêmen congelado, as taxas de parição podem ser inferiores em aproximadamente 40% e as leitegadas em um ou mais leitões, em comparação com os índices obtidos do sêmen resfriado 15 – 18°C, principalmente devido a redução da motilidade e a maior ocorrência de lesões na membrana plasmática e do acrossoma dos espermatozóides, após o descongelamento.

Os princípios do congelamento envolvem a redução do metabolismo celular através da baixa temperatura em que é exposto (-196°C) e desidratação pela hiperosmolaridade da solução crioprotetora. Esses processos causam estresse à célula espermática reduzindo a viabilidade do sêmen congelado. Uma das organelas mais importantes para integridade do espermatozóide afetada pelo congelamento é a membrana plasmática cuja composição difere entre as espécies. Nessa organela, em espermatozóides suínos, predomina ácidos graxos insaturados e a relação colesterol/fosfolípido é menor quando comparada à membrana de espermatozóides bovinos, os quais possuem predomínio de ácidos graxos saturados, possivelmente sendo essas características responsáveis pela dificuldade de obter resultados satisfatórios no congelamento de sêmen suíno diferentemente do que é observado em sêmen bovino. A integridade da membrana plasmática é de fundamental importância para o processo de fertilização, pois para que essa ocorra é necessário se estabelecer a capacitação espermática que consiste em um conjunto de alterações (sem mudanças morfológicas visíveis) que envolvem a desestabilização da membrana plasmática. Entre essas alterações

incluem: decréscimo na rigidez da membrana associada com efluxo de colesterol, redistribuição do conteúdo fosfolipídico da membrana (PATRAT et al., 2000), influxo de íons cálcio para liberação no processo de reação acrossômica, aumento do nível de AMP cíclico e pH intracelular e modificações de algumas atividades enzimáticas, principalmente a proteína quinase C (PARRISH, 1999). Lesões no acrossoma do espermatozóide comprometem a reação acrossômica reação seguinte a capacitação espermática e tem como função permitir que os espermatozóides, ao reagirem, possam penetrar na zona pelúcida, fundindo-se a membrana do oócito (YANAGIMACHI, 1994).

Durante o processo de criopreservação, o sêmen é resfriado da temperatura corpórea à temperatura ambiente (37°C – 20°C) o que parece não ocasionar danos aos espermatozóides quando estes se encontram diluídos em meio adequado (KEITH, 1998). O estresse inicial se dá quando o sêmen passa da temperatura ambiente para 5°C (SQUIRES et al 1999). Isso se deve pelo estado de transição da membrana plasmática do estado líquido cristalino para o estado gel (MEDEIROS, 2002). Nessa temperatura é adicionado o crioprotetor, posteriormente envasado e alocado em vapor de N₂L por cerca de 20 min. Após esse período é submerso em N₂L(-196°C) e armazenado.

Na temperatura de -5°C a -10°C é que se inicia a formação dos primeiros cristais de gelo no meio extracelular sendo esse um ponto crítico do congelamento, pois esse processo deve ser lento para permitir a desidratação das células com isso não produzindo gelo intracelular, e rápida o suficiente para evitar o contato da célula desidratada com o meio hiperosmótico que promoveria uma desnaturação das macromoléculas da membrana plasmática sendo deletério à célula (MEDEIROS, 2002).

Outro ponto crítico, no processo de congelamento é a possibilidade de ocorrer choque térmico o qual induz a danos parcialmente irreversíveis ao espermatozóide que se caracteriza por padrão anormal de movimento (movimento circular ou retrógrado), rápida perda de motilidade, lesões no acrossoma, danos a membrana plasmática, redução da atividade metabólica e perda dos componentes intracelulares (GRAHAM, 1996).

Com relação à formação de cristais, estes se formam no espaço extracelular criando um gradiente osmótico entre a solução intracelular inicialmente isotônica e a solução congelada extracelular que se encontra concentrada. Dependendo da velocidade de resfriamento, a água vai se mover através da membrana e se unir à fase congelada do meio extracelular ou irá se congelar, formando gelo no interior da célula. Na maioria dos casos, células submetidas à formação de cristais de gelo intracelular se tornam osmoticamente inativas devido à perda da integridade da membrana (DEVIREDDY et al 2002).

Ainda na década de 80 foram desenvolvidas pesquisas pela EMBRAPA-CNPSA referentes ao uso de sêmen suíno congelado em nível de granja mas com resultados que ainda não justificaram seu emprego substituindo o uso de sêmen resfriado (Tabela 1).

Tabela 1: Resultados médios de fertilidade de leitoas inseminadas com sêmen resfriado e congelado.

	Sêmen resfriado (34 animais)	Sêmen congelado (31 animais)
Não retorno/21 dias (%)	88,2	77,4
Prenhes (%)	85,3	74,2
N ^o de corpos amarelos	12,9	11,9
N ^o de embriões ¹	11,1	8,9
N ^o de embriões viáveis ¹	10,8	8,8

¹ :a diferença entre os dois grupos foi estatisticamente significativa (P<0,05)

Fonte: EMBRAPA-CNPSA (1986)

Toda a “manipulação” necessária para o congelamento de sêmen esta em constante aperfeiçoamento e sujeita a mudanças que visam melhorar os resultados obtidos no pós-descongelamento. Estudos atuais desenvolvidos por Bianchi *et al.* (2008a) mostram um avanço nos resultados de criopreservação,

sendo que foram observadas melhores taxas de motilidade e de integridade de membrana quando substituíram o Glicerol a 3% por Dimetilacetamida (DMA) a 5% (Tabela 2). Bianchi *et al* (2008b) também mostraram os resultados benéficos do uso da DMA a 5% como substituto do Glicerol 3% em relação a taxa de fertilidade de leitoas inseminadas pelo método de inseminação Intra-Uterina com doses de 1×10^9 espermatozóides (Tabela 3).

Tabela 2: Resultados de motilidade e integridade de membrana de sêmen suíno congelado com diferentes crioprotetores.

Crioprotetor	Motilidade (%)	Integridade de Membrana (%)
Glicerol 3%	38.1 ± 2.3 a	34.5 ± 2.8 a
Metilformamida 5%	43.2 ± 2.4 a	43.3 ± 2.5 b
Dimetilformamida 5%	50.6 ± 1.9 b	47.9 ± 2.1 b
Dimetilacetamida 5%	53.8 ± 1.7 b	50.9 ± 1.9 c

Fonte: Bianchi *et al.* 2008a. a,b,c na mesma coluna diferem estatisticamente (P<0,05).

Tabela 3: Taxa de recuperação de estruturas e efeito do tratamento sobre a fertilidade.

Parâmetro	Tratamento	
	GLICEROL 3%	DMA 5%
Leitoas inseminadas	30	30
Corpos hemorrágicos	306	299
Taxa de recuperação, %	68,9	66,9
Taxa de concepção, %	73,3	76,6
Taxa de fertilização, %	48,6	59,4

Fonte: Bianchi *et al.* 2008b. Os dados não diferem (P > 0,05).

3. TÉCNICAS DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

A IA é uma biotécnica utilizada na exploração comercial de suínos no Brasil desde a década de 70 (SCHEID, 1991), essa biotécnica vem sofrendo uma constante evolução onde novas tecnologias têm sido desenvolvidas visando incrementar ainda mais a produção de suínos em granjas tecnificadas. Dentre essas novas tecnologias podem ser citadas a utilização de um número menor de espermatozóides por dose inseminante, manejos que contemplam a possibilidade da realização de uma inseminação diária, além dos novos métodos de realização da Inseminação Artificial que serão abordados a seguir.

3.1 Inseminação Artificial Intra-Cervical (IAIC)

Essa é uma biotécnica de reprodução bem estabelecida e aplicada na suinocultura, cuja maximização do uso de ejaculados mantendo ou mesmo melhorando a eficiência reprodutiva e produtiva, quando comparada a monta natural (WENTZ & BORTOLOZZO, 1998).

O método tradicionalmente empregado na IA em suínos preconiza a utilização de uma pipeta que permite a deposição do sêmen no corpo da cérvix devido a sua conformação ser similar a extremidade do pênis do varão esse método se assimila a monta natural. Utiliza-se para esse processo uma dose inseminante com concentração entre $2,5-3,0 \times 10^9$ espermatozóides, num volume de 80 a 100mL (CORRÊA *et al.*, 2001). O processo de IA é relativamente simples, mas necessita de certos cuidados para maximizar seus resultados. É muito importante a realização da inseminação na presença de um macho maduro alocado na frente da fêmea, para que estímulos tácteis, auditivos, visuais e dos ferormônios auxiliem durante todo processo. O procedimento seqüencial inicia com a limpeza a seco da vulva com papel toalha e introdução da pipeta previamente umedecida com algumas gotas da dose inseminante, com rotação no sentido anti-horário na parede dorsal da vagina para evitar penetração na uretra. Após fixar a pipeta na cérvix, é realizada a infusão da dose inseminante num tempo aproximado de 3 a 5

minutos, sempre com estímulos dos pontos erógenos da fêmea pois quando a pipeta atinge a cervix, as ramificações nervosas presentes na musculatura, transmitem a informação para que ocorra a constrição dos anéis da cervix sobre a pipeta, iniciando uma onda de contrações uterinas que facilitam o transporte das células espermáticas até o oviduto onde ocorre a fertilização dos oócitos. Ao término da infusão de todo o conteúdo da dose inseminante, a pipeta é mantida por cerca de 15 a 20 minutos para evitar o refluxo seminal e posteriormente retirada girando-a no sentido horário.

No trato reprodutivo da fêmea são impostas barreiras aos espermatozoides, tais como a própria anatomia da cervix onde grande parte das células são perdidas, bem como a fagocitose produzida pelo sistema imune da fêmea que reconhece o sêmen como material estranho, sendo essa a principal forma de eliminação de espermatozoides, além da perda por refluxo que pode ser devido a erros no processo de inseminação.

Devido a isso, foram desenvolvidas técnicas, como IA intra-uterina e IA intra-uterina profunda, que reduzem o trajeto das células espermáticas no trato reprodutivo da fêmea, reduzindo com isso as perdas fisiológicas do sêmen.

3.2 Inseminação Artificial Intra-Uterina (IAIU)

A técnica é similar a convencional, apenas com o diferencial que consiste no emprego de um cateter que desliza pelo interior da pipeta tradicional ou pelo uso apenas do cateter, passando cerca de 20 a 25 cm da cervix chegando ao corpo uterino. Essa tecnologia permite o emprego de uma dose com 1 bilhão de espermatozoides em um volume total de 50-60 mL, o que corresponde a 1/3 do total de células empregadas nas doses com a técnica tradicional e uma redução de 25- 30% no volume de diluente consumido pela central (WATSON & BEHAN, 2002). Com isso, além da redução do custo da dose inseminante (DI), há possibilidade de potencializar o uso de machos

geneticamente superiores, incrementando o ganho genético (BORTOLOZZO et al., 2005).

Outras vantagens descritas para IAIU são: o menor refluxo ocorrido durante e após a inseminação (LEVIS *et al.* 2002); o menor tempo necessário para infusão da DI após a passagem do cateter (VAZQUEZ et al., 2000; MARTINEZ et al., 2002; WATSON & BEHAN, 2002); e a redução nos custos com aquisição e manutenção de machos, já que um macho poderá atender um maior número de fêmeas. Ainda, com o uso da IAIU seria possível utilizar tecnologias como sexagem de espermatozóides e inseminação com sêmen congelado (LEVIS et al., 2002).

Apesar dessas marcantes vantagens, a IAIU sofre algumas limitações quanto à necessidade de utilizar um cateter específico, cujo custo é maior; treinamento do pessoal para uso de tal tecnologia; a dificuldade de inseminar primíparas devido a anatomia da cérvix; o maior tempo necessário para introduzir o cateter; o aumento do risco de lesões na cérvix ou no corpo uterino e o alto nível de higienização do cateter porque sua parte interna alcança o corpo uterino (LEVIS et al., 2002).

Como na inseminação intra-uterina, o número de espermatozóides na dose inseminante é reduzido, existe a possibilidade de problemas relacionados com a qualidade da dose possam prejudicar o resultado da inseminação. Em algumas granjas comerciais observou-se que inseminando com $0,5-1,5 \times 10^9$ espermatozóides viáveis/dose por meio do sistema de inseminação intra-uterina, o índice de fecundação foi semelhante ao obtido pela inseminação tradicional com 3×10^9 espermatozóides viáveis/dose (Dallanora et al., 2003; Mezalira et al., 2003).

Estudos realizados por Watson e Behan (2002) comparando as técnicas tradicional (cervical) de inseminação com a intra-uterina em diferentes concentrações, mostram taxas de parto e leitões nascidos totais menores apenas na técnica tradicional com 1×10^9 de sptz (Tabela 4) evidenciando com isso a viabilidade da IA intra-uterina com concentração de 1×10^9 de sptz sem maiores perdas produtivas.

Tabela 4: Desempenho reprodutivo de matrizes submetidas a IA uterina ou cervical com 1, 2 e 3 bilhões de espermatozóides (sptz) por dose.

		Inseminação artificial					
		Intra-uterina			Intra-cervical		
Número de sptz (x10 ⁹)		1	2	3	1	2	3
Taxa parto(%)		65.8 b	91.8 b	91.1 b	86.9 a	92.5 b	90.5 b
Leitões nascidos totais		10.3 b	12.6 b	12.5 b	12.1 a	12.3 b	12.3 b

Fonte: Watson e Behan (2002). a, b na mesma linha diferem estatisticamente (P<0,05).

Em nível de campo, Dallanora *et al.* (2004) compararam o emprego da IA com 3 bilhões de espermatozóides, em doses de 90 mL, frente a inseminação intra-uterina com 1,5 bilhão de espermatozóides em doses de 60 mL, sendo que não foram observadas diferenças entre os dois tratamentos para taxa de parto e número de leitões nascidos (Tabela 5), mostrando que a técnica de IA Intra-Uterina com a concentração referida, pode ser uma opção viável para substituição da tradicional inseminação.

Tabela 5: Taxa de parto ajustada (TPA) e número de leitões nascidos (LN) em fêmeas inseminadas pela técnica tradicional ou intra-uterina.

Inseminação	n	SPTZ* (x10 ⁹)	TPA (%)	LN
Cervical	304	3,0	93,4	11,8±2,8
Intra-Uterina	304	1,5	92,8	11,6±2,6

Fonte: Dallanora et al., 2004.

3.3 Inseminação Artificial Intra-Uterina Profunda (IAIUP)

Na Inseminação Artificial Intra-Uterina Profunda utiliza-se um cateter de 1,20m que chega aproximadamente até o oviduto. O volume da dose inseminante é de aproximadamente 7,5 mL, contendo em torno de 150 milhões de espermatozóides, ou seja, cerca de 20 vezes menor que o método tradicional. Esse cateter entra em apenas um corno uterino e as fecundações ocorrem em ambos os cornos, mostrando que os espermatozóides promovem uma migração pelo útero, sendo esse um alvo de pesquisas promovidas por Martínez et al. (2006) que constatou que a baixa taxa de fecundação obtida teria sido devido a incidência elevada de fertilização unilateral (36% das fêmeas inseminadas), que foi completamente evitado pelo aumento da concentração para 600 milhões de espermatozóides por dose.

Em estudos com IAIUP com sêmen congelado e descongelado, usando doses com concentrações de 1×10^9 espermatozóides e volume de 7,5 ml, foram obtidas taxas de parição de 70% e um tamanho total de leitegada de 9,2 leitões (Roca et al., 2003). Estes índices são promissores, em comparação com aqueles obtidos com sêmen congelado com deposição intra-cervical, mas continua viável apenas em situações que requerem a conservação do material genético de machos de alta qualidade zootécnica.

5 – CONCLUSÕES

A criopreservação de sêmen suíno se apresenta como uma importante estratégia para preservação e melhor aproveitamento de material de alto valor genético já que permite a conservação do sêmen por tempo indeterminado, além de reduzir os custos para produção das doses, eliminar riscos sanitários e facilitar a importação e exportação do sêmen promovendo, com isso, o melhoramento genético dos rebanhos. No entanto, necessita da adaptação de novas técnicas de IA (IAIUP ou IAIU), bem como aumentar os estudos científicos relacionados à criopreservação do sêmen para maximizar

CORCINI, C.D. et al. Congelamento de sêmen suíno e seu uso em nível de granja. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 17, Ed. 122, Art. 825, 2010.

seus resultados a fim de torná-lo viável, a nível de granja pois, os resultados encontrados em experimentos realizados até o momento não maximizam os níveis alcançados pelo método de sêmen resfriado o que limita seu uso a nível de campo.

6 - BIBLIOGRAFIA

BIANCHI I., CALDERAM, K., MASCHIO, E.F., MADEIRA, E.M., ULGUIM, R.R., CORCINI, C.D., BORGALHARDO, D.C., CORRÊA, E.K., LUCIA JR, T., DESCHAMPS, J.C., CORRÊA, M.N. Evaluation of amides and centrifugation temperature in boar semen cryopreservation. **Theriogenology** 69; 632-638; 2008a.

BIANCHI, I.; CALDERAM, K.; MASCHIO, E. F.; MADEIRA, E.M.; ULGUIM, R. R.; RAMBO, G.; CORRÊA, E.K.; LUCIA, T. Jr; DESCHAMPS, J.C.; CORRÊA, M.N. Inseminação artificial intra-uterina em leitoas com sêmen criopreservado com dimetilacetamida e glicerol. **Ciência Rural**, v. 38, p. 1978-1983, 2008b.

BORTOLOZZO, F..P.; BENNEMANN, P.E.; WENTZ, Ivo. Viabilidade e impacto econômico com o uso da IA em suínos. In: BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, Ivo. INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL NA SUINOCULTURA TECNIFICADA. **Suinocultura em Ação**; p. 27-42; 2005^a.

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

CORRÊA, M.N., MEINCKE, W., LUCIA JR, T., DESCHAMPS J.C.: Inseminação Artificial em Suínos. Editora Printpar; 2001.

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

DENVIREDDY, R.V.; SWALUND, D.J.; OLIN, T.; VICENT, W.; TROEDSON, M.H.T; BISCHOF, J.C.; ROBERTS, K.P. Cryopreservation of equine sperm: optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agents determined used differential scanning calorimetry. **Biology of Reproduction**, v.66, p.222-231, 2002.

GRAHAN, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Vet. Clin. North. Am.: Equine Practice**, v.12, p.131-147; 1996.

HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science* v. 62, p.3-22, 2000.

LEVIS D.G., BURROUGHS S. & WILLIAMS 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/AIintrauterineDL.doc>. Acessado em: 09/2002.

MARTÍNEZ E.A., VÁZQUEZ J.M., PARRILLA I., CUELLO C., GIL M.A., RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ H., ROCA J., VÁZQUEZ J.L.. Incidente of unilateral fertilizations after low dose deep intrauterine

CORCINI, C.D. et al. Congelamento de sêmen suíno e seu uso em nível de granja. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 17, Ed. 122, Art. 825, 2010.

insemination in spontaneously ovulating sows under field conditions. **Reprod Domest Anim** 41, 41-47; 2006.

MATTHIJS 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.

MEDEIROS, C.M.O.; FORELL, F.; OLIVEIRA A.T.D.; RODRIGUES, J.L. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, v.57, 327-344, 2002.

MEZALIRA, A.; DALLANORA, D.; SCHIMIDT, A.C.T.; ZILLI, R. BERNARDI, M.L.; WENTZ, Ivo; BORTOLOZZO, F.P. Desempenho reprodutivo de fêmeas suínas de acordo com o macho utilizado na inseminação intra-uterina. In: **CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS.11**. Goiânia, GO. Anais. p.219-220, 2003.

KEITH, S.L. Evaluation of new cryoprotectants for the preservation of equine spermatozoa. Colorado, 1998. 104p. **Tese (Master of Science)**. Colorado State University, Fort Collins.

PALLAS, R; DE ALBA, C. Impacto de las nuevas tecnologías de Inseminación Artificial en la gestión de un centro de inseminación artificial. **Venezuela Porcina**. Año 16. Nº46:15-16; 2002.

SCHEID I.R., WENTZ, I., SOUZA N.M., MARIANO M.S. Resultados comparativos da inseminação artificial em suínos com sêmen congelado e resfriado. **EMBRAPA-CNPSA**, p. 1-2; 1986.

SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W.; GRAHAN, J.K.; VANDERWALL, D.K.; McCUE, P.M.; BRUEMMER, J.E. Principles of cryopreservation. In: **Cooled and frozen Stallion Semen**. b.09; 1999.

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

PATRAT, C., SERRES, C., JOVANNET, P. The acrosome reaction in human spermatozoa. **Biology of the Cell**, v.92, p. 225-226, 2000.

PARRISH, J.J., SUSKO-PARRISH J.L., GRAHAM J.K. In vitro capacitation of bovine spermatozoa : role of intracellular calcium. **Theriogenology**, v.51, p.461-472, 1999.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: KNOBIL, E., NEILL, J. **The Physiology of Reproduction**. New York: Ed. Raven Press, 1994.

CORRÊA M.N., MEINCKE W., LUCIA T.JR., DESCHAMPS J.C. **Inseminação Artificial em Suínos**. 2001.