

**DIFERENTES CONCENTRAÇÕES
ESPERMÁTICAS NA INSEMINAÇÃO
ARTIFICIAL INTRA-UTERINA SUÍNA**

JOANA MILLER

2007

JOANA MILLER

**DIFERENTES CONCENTRAÇÕES
ESPERMÁTICAS NA INSEMINAÇÃO
ARTIFICIAL INTRA-UTERINA SUÍNA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador
Prof. Dr. Luis David Solis Murgas

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

2007

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Miller, Joana

Diferentes concentrações espermáticas na inseminação
artificial intra-uterina suína / Joana Miller. – Lavras : 2007.
57 p. : il.

Orientador: Luis David Solis Murgas
Dissertação (Mestrado) – UFLA.
Bibliografia.

1. Inseminação intra-uterina. 2. Concentrações espermáticas. 3.
Desempenho reprodutivo. I. Universidade Federal de Lavras. II.
Título.

CDD-636.408245

JOANA MILLER

**DIFERENTES CONCENTRAÇÕES
ESPERMÁTICAS NA INSEMINAÇÃO
ARTIFICIAL INTRA-UTERINA SUÍNA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 15 de fevereiro de 2007.

Dr. Glauber de Souza Machado	Consultoria Integrall
Dr. Cláudio Pories Proserpi	UFLA
Dr. Márcio Gilberto Zangerônimo	UFLA

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

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

AGRADECIMENTOS

A **meus pais**, pela oportunidade, apoio e motivação.

À Universidade Federal de Lavras, pela excelência na educação superior, em especial ao Departamento de Medicina Veterinária, pelo acolhimento.

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

À Fazenda São Paulo, pela colaboração e acolhimento do projeto de pesquisa, expresso meus agradecimentos.

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

Enfim, a todos que contribuíram para minha formação e a Deus, que a todos observa e de todos cuida em cada momento de nossa jornada.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
3 REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1 Evolução da inseminação artificial	4
3.2 Métodos não-cirúrgicos de inseminação artificial em suínos	6
3.2.1 Inseminação intra-uterina (IIU).....	6
3.2.2 Inseminação intra-uterina profunda (IIP)	10
3.3 Inseminação artificial profunda cirúrgica em suínos	14
3.4 Biologia espermática no sêmen suíno	15
3.4.1 Motilidade espermática	17
3.4.2 Morfologia espermática.....	19
4 MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1 Local, animais e manejo	21
4.2 Determinação da concentração espermática	22
4.3 Tratamentos experimentais	23
4.4 Análise morfológica dos espermatozoides	24
4.5 Tratamentos e realização da inseminação artificial	28
4.6 Diagnóstico de gestação	30
4.7 Delineamento estatístico e análises estatísticas	30
4.6.1 Análises espermáticas.....	31
4.6.2 Análises das técnicas de inseminação artificial	32

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
5.1 Motilidade e vigor espermáticos.....	34
5.2 Morfologia espermática.....	36
5.3 Desempenho reprodutivo após a inseminação intra-uterina (IIU)	40
6 CONCLUSÕES.....	46
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
ANEXOS.....	51

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Composição química do diluidor BTS.....	24
TABELA 2. Alterações ocorridas com maior frequência nos espermatozoides do varrão.	26
TABELA 3. Motilidade espermática (%) do sêmen suíno avaliado <i>in natura</i> , após diluição (2 horas) e após 24 horas de armazenamento a 16°-19°C.	35
TABELA 4. Vigor espermático do sêmen suíno avaliado <i>in natura</i> , após diluição (2 horas) e após 24 horas de armazenamento a 16°-19°C.....	36
TABELA 5. Total de células anômalas (%) do sêmen suíno avaliado <i>in natura</i> , após diluição (2 horas) e após 24 horas de armazenamento a 16°-19°C.	37
TABELA 6. Patologias espermáticas examinadas no sêmen <i>in natura</i> e diluído de varrões.	38
TABELA 7. Alterações de gota citoplasmática proximal (%) do sêmen suíno avaliado <i>in natura</i> , após diluição (2 horas) e após 24 horas de armazenamento a 16°-19°C.	38
TABELA 8. Alterações de cauda (%) do sêmen suíno avaliado <i>in natura</i> , após diluição (2 horas) e após 24 horas de armazenamento a 16°-19°C. .	39
TABELA 9. Desempenho de cobertura das fêmeas inseminadas com a técnica intra-uterina.	41
TABELA 10. Resultados com relação à leitegada (nascidos totais – NT, nascidos vivos – NV, natimortos – NATI, mumificados – MUMIF e a média do peso dos leitões ao nascer – PN) nos quatro graus de concentração utilizados na IIU e no controle.	43

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Localização da deposição do sêmen para diferentes métodos de inseminação artificial (modificado de Levis et al. (2002).7
- FIGURA 2.** Seqüência de campos observados durante a análise morfológica do sêmen. As setas indicam o sentido da avaliação.....25
- FIGURA 3.** Alterações mais observadas na cauda, peça intermediária, cabeça e acrossoma dos espermatozoides (Furtado et al., 2006).27
- FIGURA 4.** Pipeta de inseminação intra-uterina, com cateter semi-rígido (Roca et al., 2006).29

RESUMO

MILLER, Joana. **Diferentes concentrações espermáticas na inseminação artificial intra-uterina suína**. 2007. 57 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência da inseminação intra-uterina (IIU) em suínos, considerando as taxas de retorno ao estro, aborto, parto, além do tamanho da leitegada (número de leitões nascidos, nascidos vivos, natimortos, mumificados) e peso do leitão ao nascer. Na IIU, as fêmeas foram inseminadas nos tempos de 24 e 48 horas após a detecção do estro, utilizando-se as concentrações de 500 milhões, 1 bilhão, 1,5 bilhão e 2 bilhões de espermatozoides, em 20 mL de diluente. A passagem do cateter de IIU através da cérvix foi possível em 97,9% das fêmeas. Foi realizado diagnóstico de retorno ao estro a partir do 18º dia e diagnóstico de gestação por ultra-sonografia transcutânea entre o 28º e 30º dias após a inseminação. A taxa de retorno ao estro foi de 6,3% na IIU. A taxa de parto na IIU foi de 87,2%, sendo a taxa de parto para a concentração de 500 milhões de 100%. Com relação ao número de leitões nascidos totais, nascidos vivos e peso do leitão ao nascer, não houve diferenças entre as diferentes concentrações espermáticas ($P>0,05$). O número de natimortos e mumificados observados nas fêmeas inseminadas com IIU não apresentou diferenças ($P>0,05$). A utilização da concentração de 500×10^6 espermatozoides em 20 mL de diluente, com inseminação intra-uterina, permitiu a obtenção de bom desempenho reprodutivo.

¹ Comitê Orientador: Luis David Solis Murgas – UFLA (Orientador), Márcio Gilberto Zangerônimo – UFLA (Co-orientador).

ABSTRACT

MILLER, Joana. **Different spermatic concentrations on the intrauterine artificial insemination in swine.** 2007. 57 p. Dissertation (Master in Veterinary Sciences) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.²

The aim of this work was to evaluate the efficiency of the intrauterine insemination (IUI) in swine, considering the conception rate, farrowing rate, litter size (alive, stillborn and mummified) and pig born weight. In the IUI, the females had been inseminated at 24 and 48 hours after the oestrus detection, and had been used the inseminating doses with 500 million, 1 billion, 1.5 billion and 2 billion spermatozoa in 20 mL of extender. The procedure of catheter insertion through the cervical canal was successfully performed in 97,9% of females. It was carried out the conception rate from the 18th day and ultrasonic pregnancy diagnosis was undertaken at 28-30 days post-service. The conception rate was of 6,3% in the IUI. The farrowing rate in IUI was of 87,2%, being the farrowing rate in 100% for the spermatic concentration of 500 million. In relation with the number of born pigs, alive, stillborn, mummified and pig born weight observed in the females inseminated with IUI did not differ ($P>0.05$). The use of the concentration of 500×10^6 spermatozoa in 20 mL of extender, with intrauterine insemination, result in optimal reproductive performance.

² Guidance Committee: Prof. Dr. Luis David Solis Murgas – UFLA (Adviser), Márcio Gilberto Zangerônimo – UFLA.

1 INTRODUÇÃO

A melhora da nutrição e do manejo dos animais, o controle das enfermidades, a seleção genética e a inseminação artificial são considerados os principais fatores responsáveis pelo aumento dos rendimentos na produção de suínos.

A biotecnologia da reprodução avaliada no rebanho suíno é representada, quase que exclusivamente, pelo emprego da inseminação artificial (IA) com sêmen diluído e conservado em refrigeração. Esta é uma prática mais econômica, trazendo benefícios pela difusão rápida de características desejáveis no rebanho, como maior ganho de peso e conversão alimentar, melhor qualidade de carcaça, menor deposição de gordura e melhor aproveitamento de machos geneticamente superiores.

Atualmente, mais de 50% do total de fêmeas em produção no mundo são inseminadas artificialmente. Em alguns países, como Estados Unidos e Espanha, estas porcentagens são superiores a 85% dos animais. O início da IA ocorreu na Rússia, no começo do século XX, mas seu desenvolvimento foi pleno somente a partir dos anos 1950-1960. Esta técnica permite a redução de enfermidades de transmissão sexual, o aumento dos rendimentos dos reprodutores, o controle dos ejaculados e um aumento na genética das leitegadas.

Na inseminação artificial tradicional (IAT) ou intracervical, realizada na região das pregas cervicais do trato reprodutor da fêmea suína, utiliza-se a dose inseminante com concentração de 2 a 4 bilhões de espermatozoides, diluídos em 80 a 100 mL de diluente, e a inseminação é repetida de duas a três vezes durante o estro, totalizando até 12 bilhões de espermatozoides por fêmea inseminada.

A necessidade de grande volume e número de espermatozoides na dose inseminante deve-se, provavelmente, às características anatômicas da cérvix e cornos uterinos da fêmea suína. A cérvix e os cornos uterinos, estes com comprimento de 100 cm ou mais, representam grandes barreiras fisiológicas à chegada das células espermáticas ao reservatório na junção útero-tubárica. Nesse trajeto, os espermatozoides são expostos à ação fagocitária de polimorfonucleares que, juntamente com o refluxo, representam as principais formas de eliminação espermática do trato genital feminino.

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

Com o uso da IIU, há a possibilidade de potencializar o uso de machos geneticamente superiores, sendo possível a produção de 2 a 3 vezes mais doses por ejaculado, trazendo como resultado uma redução de machos no plantel. Foram desenvolvidos instrumentos que viabilizam a deposição do sêmen o mais próximo possível do local de fecundação, de forma não-cirúrgica, possibilitando o uso de um menor número de espermatozoides no processo de IA. Porém, existem poucos estudos comparativos entre as duas técnicas, em condições de campo, realizados em granjas comerciais.

2 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

1. avaliar a motilidade, o vigor e a morfologia espermáticos de 4 concentrações utilizadas na inseminação intra-uterina (500 milhões, 1 bilhão, 1,5 bilhão e 2 bilhões de espermatozóides) diluídas em 20 mL de diluente, nos tempos de 2 horas e 24 horas.

2. avaliar a eficiência da inseminação intra-uterina realizada 24 e 48 horas após a detecção do cio, analisando a taxa de retorno ao estro e de parto, além do número de leitões nascidos (nascidos vivos, natimortos, mumificados).

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Evolução da inseminação artificial

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

Segundo Levis (2002), as técnicas e aplicações da IA tiveram uma grande melhora desde a primeira técnica viável para inseminar fêmeas, em 1948. Durante as décadas de 1950 e 60, pesquisas no transporte espermático, em marrãs e pluríparas inseminadas com doses diferindo em volume e número de espermatozoides, sugeriram que era necessária uma dose de $5-10 \times 10^9$ espermatozoides em 100 mL de diluidor, para se conseguir uma ótima taxa de fertilidade (Belstra, 2002). Mas, entre o final dos anos 1950 e o início dos anos 60, surgiu a possibilidade de redução do volume e do número de espermatozoides na dose inseminante por meio da deposição diretamente dentro dos cornos uterinos por Hancock, citado por Dallanora et al. (2003).

O procedimento da inseminação tradicional, padronizado nos anos 1970, foi desenvolvido por Melrose e O'Hagen, na metade dos anos 1950, e é usado até hoje, no mundo todo, pela indústria suína (Roca et al., 2006). Com a melhoria na qualidade dos diluentes, foi possível diminuir o número de espermatozoides por dose inseminante, com valores de $2,5-4 \times 10^9$ espermatozoides em 70-100 mL (Belstra, 2002), utilizados até hoje na inseminação artificial tradicional (IAT), convencional (Gil et al., 2001; Martinez et al., 2005; Watson & Behan 2002). O protocolo utilizado na IAT se baseia na

deposição de um grande número (geralmente mais de 2500×10^6 células espermáticas) em uma dose de 80-100 mL, duas ou três vezes, durante o período do estro (Johnson et al., 2000).

A partir do final dos anos 1990, reiniciaram-se os estudos sobre a técnica de inseminação intra-uterina (IIU) e a deposição do sêmen dentro do corpo ou corno uterino, tanto de forma cirúrgica como não-cirúrgica, possibilitando a utilização de reduzido número de espermatozóides e volume, sem prejuízo do desempenho reprodutivo (Vazquez et al., 2003).

As primeiras pregas cervicais são os locais habituais da deposição do sêmen na monta natural ou IAT. Após duas horas e meia da deposição do sêmen, aproximadamente 70% do volume e 25% dos espermatozóides inseminados são perdidos através do refluxo vaginal. Diferentes instrumentos estão sendo desenvolvidos para progredir todos os anéis cervicais (15-25 cm de comprimento) e depositar o sêmen no corpo ou corno uterino (Belstra, 2002).

As potenciais vantagens das técnicas de IIU são as taxas de fertilidade comparáveis às obtidas com a IAT com número reduzido de espermatozóides e podendo ser utilizada com outras técnicas, como sêmen sexado e transferência de embrião, em situações comerciais. Por outro lado, estas técnicas podem aumentar a chance de causar ou agravar injúrias cervical ou uterina já existente (sangramento pós-inseminação) e a introdução de infecções uterinas (Belstra, 2002).

3.2 Métodos não-cirúrgicos de inseminação artificial em suínos

Segundo Gil et al. (2001), apenas 5 milhões de espermatozóides são necessários, na junção útero-tubárica de cada corno, sendo suficientes para garantir níveis de fertilização adequados e tamanhos de leitegada normais. Os grandes benefícios da IIU podem ser resumidos em: redução do volume da dose inseminante, redução do número total de espermatozóides por dose, maior número de doses por ejaculado, redução do número de varrões e das instalações necessárias, redução do custo de compra e manutenção dos machos e maior aproveitamento dos reprodutores geneticamente superiores.

O número de espermatozóides necessários no local de fertilização após uma inseminação regular é influenciado por vários fatores como volume da dose inseminante, refluxo de sêmen, fagocitose, contratilidade do útero e perda espermática por transporte rápido para a cavidade abdominal. Adicionalmente, o movimento do espermatozóide na junção útero-tubárica é afetado pelo tempo de ovulação e o número de espermatozóides presentes na porção uterina da junção útero-tubárica.

3.2.1 Inseminação intra-uterina (IIU)

A IIU é um processo que consiste em alocar os espermatozóides diretamente no corpo uterino, ao contrário da deposição intracervical, tradicionalmente realizada. O corpo uterino está localizado entre a cérvix e os cornos uterinos, tendo, aproximadamente, de 3 a 6 centímetros de comprimento. Segundo Levis (2002), as células espermáticas são depositadas cerca de 20

centímetros mais profundamente no trato reprodutivo feminino e os espermatozoides precisam transpor os cornos uterinos (marrãs – 100 a 116 cm e pluríparas – 110 a 140 cm de comprimento) (Figura 1).

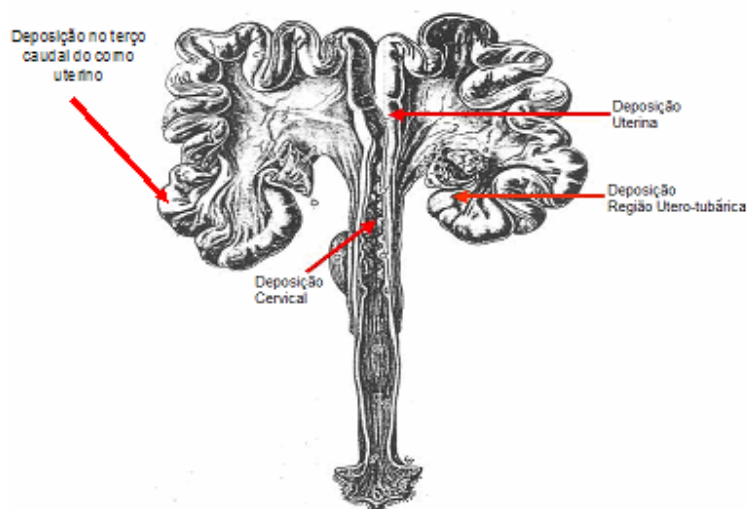


FIGURA 1. Localização da deposição do sêmen para diferentes métodos de inseminação artificial (modificado de Levis et al. (2002).

A cérvix representa a maior barreira para a IA e, na técnica de IIU, se deposita o sêmen diretamente dentro do útero, estimulando-se efetivamente as ondas peristálticas e facilitando o transporte dos espermatozoides até a junção útero-tubárica. Watson & Behan (2002) relatam uma possível redução da necessidade de um elevado número de espermatozoides.

Um cateter não traumático foi desenvolvido para permitir a passagem com facilidade através da cérvix, fazendo com que a dose inseminante seja

depositada no corpo uterino de fêmeas pluríparas. O uso da IIU, combinado com à substancial redução do número de espermatozóides, eleva a possibilidade de ganhos produtivos (Watson & Behan, 2002).

Gil et al. (2001) concluíram que, com a utilização da IIU, pode-se reduzir consideravelmente o número de espermatozóides por dose e o volume das doses também, sem produzir efeitos deletérios aos parâmetros reprodutivos.

Watson & Behan (2002) utilizaram doses de 1, 2 e 3 bilhões de espermatozóides diluídos em 80 mL, com deposição tradicional ou intra-uterina, em condições de campo. As 3240 fêmeas utilizadas foram selecionadas para ordem de parto superior a 2 e intervalo desmame-estro de 4 a 6 dias. As fêmeas foram inseminadas na hora 0 (no dia em que o estro foi diagnosticado como positivo) e 24 horas após. As doses inseminantes foram produzidas em “split-sample”, ou seja, todos os seis tratamentos foram inseminados com doses produzidas a partir do mesmo ejaculado. O instrumento utilizado para a deposição intra-uterina consistia de uma pipeta convencional de IA com um cateter interno, o qual se projeta por 20 cm além da extremidade desta. Não existiram diferenças na taxa de parto entre as doses com 1 (86,9%), 2 (92,5%) e 3 (90,5%) bilhões de espermatozóides com IIU e 2 (91,8%) e 3 (91,1%) bilhões com IAT. Apenas a IAT com 1 bilhão de espermatozóides apresentou taxa de parto (65,8%) significativamente menor. Também não houve diferença no tamanho da leitegada entre as doses 2 e 3 bilhões com IAT e todos os grupos da IIU. Na IAT, o tamanho da leitegada foi significativamente menor nas fêmeas inseminadas com 1 bilhão (10,3) em comparação àquelas com 3 bilhões de espermatozóides (12,5).

Dallanora (2004), utilizando os métodos de IAT (3×10^9 espermatozóides em 90 mililitros) e IIU ($1,5 \times 10^9$ espermatozóides em 60 mililitros), em condições comerciais, inseminou 608 fêmeas de ordem de parto

de 2 a 4, intervalo desmame-estro de 2 a 6 dias, para a avaliação do desempenho reprodutivo (tamanho da leitegada – nascidos vivos, mumificados e natimortos). As inseminações seguiram o protocolo utilizado pela granja: 12, 24, 36 e 60 horas após o início do estro. As doses inseminantes foram produzidas em “split-sample”. Não houve diferença ($P>0,05$) nas taxas de retorno ao estro, de prenhez, de parto e de número de leitões nascidos. Também não foram observadas diferenças ($P>0,05$) em nenhum dos parâmetros de desempenho reprodutivo analisados, indicando que a deposição intra-uterina permite a formação eficiente do reservatório espermático na junção útero-tubárica e adequada fecundação a partir de uma dose inseminante com menor número de espermatozoides. A deposição de 1,5 bilhão de espermatozoides com IIU permite atingir dados de desempenho reprodutivo equivalentes à IAT, com uma redução de 50% no número de espermatozoides e um terço no volume do diluente.

Bennemann et al. (2003) utilizaram a técnica intra-uterina na inseminação de 57 fêmeas, de ordem de parto de 3 a 7, com doses de 1 e 2 bilhões de espermatozoides, em 60 mL, e intervalos pré-ovulatórios de 0 a 24 horas ou 25 a 36 horas. A taxa de prenhez (82,1% e 96,5%), o número de embriões totais (16,3 e 14,7) e a sobrevivência embrionária (70,8% e 64,1%) para 1 e 2 bilhões de espermatozoides, respectivamente, não foram influenciados pelo número de espermatozoides na dose nem pelo intervalo pré-ovulatório.

Mezalira et al. (2003) inseminaram 211 fêmeas com ordem de parto de 2 a 6, utilizando uma pipeta para IIU e doses de 1 bilhão, 500 milhões e 250 milhões de espermatozoides em 20 mL, com uma única dose direcionada para um intervalo de 0 a 24 horas antes da ovulação. As fêmeas foram abatidas aos 34-41 dias para a contagem de embriões e os resultados mostraram a possibilidade de obtenção de taxas de prenhez superiores a 85% e 14 embriões,

utilizando 500 milhões de espermatozóides com deposição intra-uterina do sêmen, em intervalo de 0 a 24 horas antes da ovulação.

Portanto, diversos estudos científicos, como os citados acima, concluíram que a inseminação com 1×10^9 espermatozóides por dose com IIU não alterou os índices produtivos, quando comparados com os obtidos utilizando a IAT com 3×10^9 espermatozóides por dose.

3.2.2 Inseminação intra-uterina profunda (IIP)

Na IIP, o sêmen é depositado, não-cirurgicamente, no terço final de um corno uterino (aproximadamente 25 cm da junção útero-tubárica), pela inserção de um endoscópio de fibra óptica flexível (Martinez et al., 2001), ou por um cateter secundário menos dispendioso, flexível, mas sem o endoscópio de fibra óptica (Martinez et al., 2002; Roca et al., 2003; Vazquez et al., 2003), guiado por um cateter modificado.

Pesquisas demonstraram que, quando o espermatozóide é depositado perto da junção útero-tubárica de um corno, este se torna capaz de alcançar o oviduto contra lateral e fertilizar os ovócitos (Martinez et al., 2002).

Com o uso do endoscópio de fibra óptica (EFO), Martinez et al. (2001) desenvolveram uma técnica com deposição intra-uterina profunda, sem a sedação das fêmeas. O EFO flexível (comprimento 1,35 metro, diâmetro externo 3,3 milímetros, diâmetro interno 1,2 milímetro) foi utilizado em combinação com uma câmera de vídeo e uma fonte de luz fria. Estes autores utilizaram um protocolo hormonal para a inseminação intra-uterina.

Apenas cerca de 1 milhão de espermatozóides atingem a junção útero-tubárica e cerca de mil espermatozóides atingem o reservatório espermático localizado na porção caudal do istmo, onde as células espermáticas podem ficar armazenadas sem a redução de sua habilidade reprodutiva, até no momento antes da ovulação. Uma quantidade suficiente de espermatozóides para manter uma fertilização adequada é estabelecida no reservatório do istmo até uma hora após a monta natural. A perda rápida de espermatozóides é causada, principalmente, pelo refluxo de sêmen nas primeiras horas após a IA e pela intensiva fagocitose uterina por polimorfonucleares, que invadem o útero antes de duas horas pós-IA (Martinez et al., 2001). Segundo Bortolozzo et al. (2006), os polimorfonucleares colonizam o útero 30 minutos após a inseminação, principalmente os leucócitos, permanecendo por até 24 horas após a IA.

As taxas de parto após IIP não apresentaram diferenças da observadas após a IAT, com 3×10^9 espermatozóides. O tamanho da leitegada também foi similar entre IIP e IAT.

O cateter flexível com *design* especial (CFE) tem 1,80 metro de comprimento, diâmetro externo 4 milímetros, diâmetro interno 1,8 milímetro, o qual é inserido dentro de uma pipeta de inseminação espiralada, ultrapassa os anéis cervicais e progride para um dos cornos uterinos tão próximo à junção útero-tubárica quanto possível (Roca et al., 2003). A distância da vulva até o oviduto é de aproximadamente 1,8 metro (Levis et al., 2002), o mesmo tamanho do cateter flexível, permitindo a deposição do sêmen bem próximo à junção útero-tubárica. Dessa forma, requer um número bem reduzido de espermatozóides e volume da dose, como sêmen descongelado ou sexado, os quais têm um tempo de sobrevida curto no trato reprodutor feminino.

O procedimento utilizado na IA envolve a deposição de um grande número de espermatozóides descongelados ($5-6 \times 10^9$ células) em um grande

volume de líquido (80-100 mL) dentro do canal cervical. É necessário usar um alto número de espermatozoides congelados-descongelados, pois há insuficiente colonização dos reservatórios espermáticos no oviduto, resultando em um número inadequado de espermatozoides com funcionalidade intacta no oviduto para alcançar a fertilização. A IA de suínos com sêmen descongelado obtém resultados de taxa de concepção 20% inferiores em relação à taxa de concepção do sêmen resfriado. Conseqüentemente, o uso de sêmen congelado nos programas comerciais de IA em suínos é bastante limitado (Roca et al., 2003).

Roca et al. (2003) avaliaram a fertilidade de fêmeas desmamadas usando a IIP com sêmen congelado (motilidade média de 46% a 62% após o descongelamento) e sêmen fresco (4 a 6 horas após a coleta e diluição). Nesse estudo, as fêmeas tiveram o estro induzido com eCG e hCG. Uma única IA foi realizada 36 a 40 horas após a aplicação de hCG. Os autores compararam quatro tratamentos: 1×10^9 espermatozoides (congelados)-IIP (n=49); 6×10^9 espermatozoides (congelados)-IAT (n=33); 150 milhões (sêmen fresco)-IIP (n=29), e 3×10^9 (sêmen fresco)-IAT (n=52), este último com IA 12 e 24 horas após o início do estro. Nos três primeiros tratamentos, o volume da dose foi de 5 mL. Foram observadas taxas de prenhez de 79,6% e 82,8%, quando foram utilizadas as técnicas IIP com 1 bilhão de espermatozoides congelados e com 150 milhões de sêmen fresco, respectivamente e de 78,8% com IAT e 6 bilhões de espermatozoides congelados. Não houve diferenças nas taxas de prenhez, de parição e tamanho de leitegada entre os tratamentos (Roca et al., 2003).

O desempenho reprodutivo das fêmeas inseminadas com sêmen descongelado usando o procedimento de IIP não diferiu estatisticamente ($P>0,05$) das fêmeas inseminadas com sêmen resfriado usando IIP ou sêmen congelado usando IAT. A eficiência da inseminação observada neste experimento confirma os resultados obtidos por outros autores e demonstra que a IIP é um

procedimento fácil e confiável para a deposição do sêmen no corno uterino e causar estresse mínimo nas fêmeas (Roca et al., 2003).

Vazquez et al. (2003), utilizando a técnica de sexagem de espermatozoides por citometria de fluxo, utilizaram doses com 70 e 140 milhões de espermatozoides, submetidos ou não à sexagem. No experimento 1, fêmeas (n=200) foram desmamadas e induzidas ao estro com eCG/hCG. As inseminações com espermatozoides, sexados ou não, foram empregadas utilizando-se usando um cateter flexível com *design* especial. As taxas de parto observadas foram de 39,1% e 78,7%, com 70 milhões de espermatozoides sexados e não-sexados, respectivamente, e 46,6% e 85,7%, com 140 milhões de espermatozoides sexados e não-sexados, respectivamente.

O tamanho da leitegada nas fêmeas inseminadas com espermatozoides sexados demonstrou uma tendência a ser menor que nas fêmeas inseminadas com os espermatozoides não-sexados. No experimento 2, as fêmeas (n=140) foram inseminadas como no experimento 1, exceto que foi utilizado o cio natural das fêmeas. Os ovários destas fêmeas foram avaliados por ultra-sonografia transretal. As taxas de parto obtidas foram de 25% e 77,2%, com 70 milhões de espermatozoides sexados e não-sexados, respectivamente, e 32% e 80,9%, com 140 milhões de espermatozoides sexados e não-sexados, respectivamente ($P>0,05$). Estes resultados demonstraram que a tecnologia da IIP pode ser usada com sucesso para produzir leitões a partir de sêmen sexado, quando as fêmeas são tratadas hormonalmente para induzir a sincronização do estro e ovulação. Após a sexagem, o espermatozoide tem um tempo de vida curto. Dessa forma, é de extrema necessidade a deposição de sêmen sexado bem próximo do local de fertilização, para evitar a morte prematura que ocorreria durante o trânsito espermático desde a cérvix até o oviduto (Vazquez et al., 2003).

3.3 Inseminação artificial profunda cirúrgica em suínos

Em suínos, quando o sêmen é depositado cirurgicamente perto da junção útero-tubárica, o número de espermatozóides e o volume da dose podem ser reduzidos para 1×10^7 espermatozóides e 0,5 mL, respectivamente, sem um decréscimo no potencial de fertilização comparado com a IAT usando 3×10^9 espermatozóides em 80 mL de diluente (Krueger et al., 1999; Krueger & Rath, 2000).

Krueger et al. (1999) realizaram dois experimentos com inseminação intra-uterina profunda cirúrgica em suínos, com o objetivo de determinar a concentração mínima de espermatozóides com um volume baixo da dose inseminante, sem diminuir as taxas de fertilidade e o tamanho de leitegada. As taxas de prenhez e de parição não tiveram diferenças significativas, exceto com a menor concentração de espermatozóides que foi inseminada 32 ou 38 horas após o tratamento de hCG. Não houve diferença entre os grupos inseminados no tamanho da leitegada, número de nascidos vivos, mumificados e natimortos. O peso dos leitões variou de 1,1 kg a 1,6 kg e não houve diferença entre os grupos. Estes autores concluíram que o baixo volume de 0,5 mL foi suficiente para a inseminação intra-uterina profunda.

Krueger & Rath (2000) realizaram um experimento para determinar o número mínimo de espermatozóides necessários, não havendo redução na taxa de prenhez e no tamanho da leitegada, utilizando a inseminação intra-uterina profunda cirurgicamente em fêmeas desmamadas. Não houve diferenças significativas entre os resultados destes grupos e os obtidos dos grupos inseminados tradicionalmente. Tanto o número de leitões nascidos vivos como o número de natimortos não foram significativamente diferentes entre os grupos inseminados cirurgicamente e os grupos controle. O número total de nascidos em

cada grupo também não foi diferente estatisticamente. Os resultados demonstraram que o número de espermatozoides que deve ser utilizado na inseminação intra-uterina cirúrgica pode ser reduzido, sem que ocorra redução no potencial de fertilização.

Mesmo a laparotomia não sendo um procedimento prático para inseminar pluríparas e marrãs na granja, por causa da assepsia necessária de procedimentos cirúrgicos, uma alternativa é a laparoscopia. Esta é uma técnica menos invasiva que a laparotomia, por depositar o sêmen diretamente dentro do útero, podendo ser realizada na granja, com pessoal tecnicamente treinado. Esta técnica é viável para sêmen congelado-descongelado e sêmen sexado. Vazquez et al. (2005) demonstraram o procedimento da laparoscopia com a deposição de sêmen no oviduto. Utilizando a laparoscopia, os autores obtiveram taxas de prenhez acima de 80%, com um número reduzido de espermatozoides sexados ($0,3 \times 10^6$) por corno uterino. O último estudo também demonstrou que os espermatozoides devem ser depositados momentos antes da ovulação, para obter a máxima taxa de fertilização, por causa do pequeno tempo de vida de espermatozoides, após a sexagem, dentro do trato reprodutor feminino (Roca et al., 2006).

3.4 Biologia espermática no sêmen suíno

Desde os primeiros estudos realizados com o armazenamento de sêmen de suínos, percebeu-se que apenas uma pequena porção dos espermatozoides da amostra original sobrevive a qualquer tipo de preservação. Também se sabe que a sobrevivência das células espermáticas é muito melhor quando o sêmen é armazenado sob refrigeração do que congelado. Quando a temperatura diminui,

há uma inevitável redução na proporção de espermatozóides que mantêm os componentes bioquímicos e estruturais, e a integridade de membrana normais (Johnson et al., 2000).

Dois fatores importantes influenciam na função dos espermatozóides durante a diluição e o armazenamento do sêmen: a temperatura e as condições de suspensão do meio. O espermatozóide suíno é muito susceptível ao choque térmico. Isso ocorre quando o sêmen fresco é resfriado rapidamente, passando da temperatura corporal para temperaturas próximas de 15°C, o que resulta numa perda da viabilidade de um grande número dos espermatozóides. Quando o sêmen diluído permanece na temperatura ambiente por algumas horas, antes de ser armazenado a 15°C, o espermatozóide adquire uma resistência gradual ao choque térmico (Johnson et al., 2000). Segundo Nascimento et al. (1998), as características físicas das células espermáticas mantiveram-se satisfatórias e a integridade do acrossoma foi superior a 95%, armazenado por 24 horas à uma temperatura de 16°C.

Segundo Watson (1996), citado por Johnson et al. (2000), sabe-se que o choque térmico está relacionado com a composição lipídica da membrana espermática afetando sua fluidez. Quando a temperatura é reduzida, ocorrem restrições do movimento lateral da membrana celular resultando em uma transição da forma fluida para a forma de gel (Johnson et al., 2000).

A porcentagem de colesterol é outro fator que influencia o comportamento termotrópico de espermatozóide. A proporção de colesterol:fosfolipídios no reprodutor suíno é muito baixa, e o colesterol distribuído assimetricamente está presente com maior frequência na porção externa, comparada com a porção interna da membrana plasmática. Esta combinação resulta na vulnerabilidade maior da porção interna da membrana fosfolipídica ao choque térmico (Johnson et al., 2000).

O espermatozóide é diluído com fluidos seminais das glândulas acessórias no momento da ejaculação e sua motilidade é mantida sem perda por algumas horas. Para conseguir manter sua sobrevivência *in vitro*, é necessário reduzir sua atividade metabólica com inibidores químicos ou com a diminuição da temperatura (Johnson et al., 2000).

3.4.1 Motilidade espermática

A redução da motilidade que ocorre durante o armazenamento é o principal parâmetro utilizado para avaliar o decréscimo da capacidade de fertilização. A diminuição de ATP e AMP cíclico também são características do decréscimo de motilidade (Johnson et al., 2000).

A motilidade progressiva do espermatozóide é um indicador de metabolismo ativo e membranas intactas. O sêmen armazenado deve ser examinado diariamente, com valores de motilidade acima de 60%, para serem considerados satisfatórios (Johnson et al., 2000).

Segundo Hunter (1981), citado por Bortolozzo et al. (2006), somente uma pequena subpopulação de espermatozóides é transportada, em questão de minutos, até a junção útero-tubárica. Esse transporte é passivo, ou seja, ocorre em decorrência das contrações do miométrio. O transporte espermático ativo, inerente à motilidade da célula espermática, tem um papel secundário na distância percorrida no trato genital feminino até a colonização da junção útero-tubárica.

Para avaliar se há uma subpopulação que primeiro coloniza o reservatório espermático, Rodríguez-Martínez et al. (2005) coletaram os

primeiros 10 mL da fração rica (porção I) e, em outro recipiente, o resto da fração rica e a fração pobre (porção II). A porção I foi corada com o corante fluorescente Hoechst 33252, enquanto que a porção II foi mantida sem corante. As fêmeas foram inseminadas e abatidas 3 horas após a IA, para análise da junção útero-tubárica e porção adjacente do istmo (reservatório espermático). Os resultados mostraram que os espermatozóides corados da primeira porção da fração rica colonizam primeiramente o reservatório espermático, demonstrando que os espermatozóides da fração rica apresentam motilidade mais expressiva (Bortolozzo et al., 2006). Os espermatozóides presentes nos primeiros 10 mL da fração rica toleram melhor o estresse associado aos procedimentos de armazenamento e congelamento-descongelamento. Os dados sugerem, portanto, que as diferentes frações do ejaculado afetam a viabilidade espermática em suínos (Bortolozzo et al., 2006).

Após a deposição no trato genital feminino, os espermatozóides são transportados de forma ativa, em que a motilidade própria da célula será responsável pelo seu deslocamento e de forma passiva, na qual as contrações uterinas e os movimentos ciliares desempenham papel fundamental. O transporte ativo, determinado pela motilidade espermática, tem importância fundamental no transporte do sêmen, especialmente na passagem pela junção útero-tubárica e na penetração do oócito. A motilidade espermática permite, ainda, a permanência dos espermatozóides em suspensão no lúmen uterino, evitando, assim, a aderência dos mesmos às paredes do endométrio e sua conseqüente fagocitose. Alguns estudos demonstraram que os espermatozóides já podem ser encontrados no oviduto cinco minutos após a IA. Como a longa distância que compreende o local de deposição até o oviduto é percorrida rapidamente, fica evidente que a participação do transporte espermático ativo desempenha um papel minoritário (Vidor et al., 2002)

O transporte ativo depende da motilidade inerente do espermatozóide. Mas, o grande responsável pelo deslocamento rápido das células espermáticas é o transporte espermático passivo, oriundo das contrações longitudinais do útero. Outro exemplo da importância do transporte espermático passivo foi demonstrado por Baker & Degen (1972), citado por Vidor et al. (2002). Estes autores observaram que os espermatozoides mortos depositados no trato genital feminino podem, também, alcançar o oviduto. Nesse sentido, o plasma seminal é um potente estimulador dessa atividade de contração uterina, possivelmente por conter ocitocina e prostaglandinas. Para a obtenção de bons resultados de fecundação, um número suficiente de espermatozoides viáveis deve estar presente no reservatório espermático, no momento da ovulação (Vidor et al., 2002).

3.4.2 Morfologia espermática

O exame de morfologia espermática faz parte da avaliação qualitativa do ejaculado e permite a determinação da frequência de cada uma das anormalidades espermáticas e do percentual total de alterações na amostra de sêmen armazenada. É utilizado como indicativo de potencial fecundante do ejaculado, pois as alterações interferem na capacidade de movimentação e fecundação do espermatozóide, de acordo com a localização do defeito. Este exame é uma ferramenta fundamental para o descarte do ejaculado, e até mesmo, do reprodutor (Furtado et al., 2006).

Um exame morfológico completo é recomendado quando reprodutores novos são introduzidos nas centrais de inseminação ou durante uma rotina regular de exames. Sem considerar a incidência de gota citoplasmática distal, a

porcentagem de outras alterações não deve ultrapassar 20%. É recomendado o uso de microscópio de contraste de fase, fixando a amostra com formol-citrato, como recomendado por Pursel et al. (1972), citados por Johnson et al. (2000), para realizar um bom exame. Segundo De Ambrogi et al. (2006), a qualidade do sêmen é considerada normal com valores acima de 50×10^9 como número total de espermatozoides por ejaculado, motilidade inicial igual ou maior que 70% e com mais de 85% de espermatozoides com morfologia normal, podendo prover uma boa taxa de fertilidade após a monta natural ou IA, com sêmen preservado de forma líquida.

Alto percentual de defeitos pode representar alterações durante a espermatogênese ou no trânsito e maturação do epidídimo ou, mesmo, manipulação inadequada. É recomendado que o exame morfológico seja realizado a cada ciclo espermático (60 dias aproximadamente) como forma de monitoramento da qualidade seminal dos reprodutores (Furtado et al., 2006).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local, animais e manejo

O experimento foi realizado numa granja comercial, Fazenda São Paulo,] com produção de suínos em ciclo completo, na região oeste do estado de Minas Gerais, entre os meses de março a dezembro de 2006, localizada no município de Oliveira, MG (latitude 20°41'47" Sul e longitude 44°49'38" Oeste, com altitude de 982 metros).

Foram utilizados oito machos da genética Agrocere Pic (linhagens 337 TG-Sup e 412 TG-Sup) para a realização das doses inseminantes e 48 fêmeas pluríparas da linhagem Cambourough 22[®], genética Agrocere Pic, com ordem de parto de 2 a 10, intervalo de desmame-estro entre 3 e 6 dias, duração da lactação de 18 a 21 dias e tamanho médio de leitegada nos partos anteriores superior a oito leitões.

Os machos foram mantidos em baias individuais (9 m²), sendo alimentados com ração de gestação (EM = 2900 kcal/kg), recebendo 3,0 kg, com frequência de dois arraçoamentos por dia.

A cada 4 a 6 dias foi realizada uma coleta em cada reprodutor, mantendo-se um intervalo de repouso para o mesmo. Foi empregada a técnica da mão enluvada para a coleta de sêmen, utilizando-se manequim fixo e coletando-se apenas a fração rica do ejaculado. Antes de se realizar a coleta, procedeu-se a lavagem com água e posterior secagem do prepúcio com papel-toalha, para retirada da urina, de sujidades e debris celulares acumulados no divertículo prepucial. Após a limpeza, o varrão foi conduzido até a baia de coleta. O

ejaculado foi coletado em frasco de 500 mL, aquecido a 35°C com filtro de disco (Hygia Favorit II[®], Q: 200, Ø: 230mm) para a separação da fração gel do restante do sêmen.

Finalizada a coleta, o sêmen foi encaminhado imediatamente para o laboratório localizado ao lado da baía de coleta, para a realização das análises macroscópicas: volume (visualização no copo coletor), odor, coloração, e análises microscópicas: concentração, motilidade (%), vigor (escala de 1 a 5) e morfologia espermáticas. Na seqüência, foi realizada a diluição nas concentrações pré-determinadas, permanecendo em temperatura ambiente por 2 horas, protegido da luz. Após este tempo, as amostras foram armazenadas em uma incubadora de 16°-19°C.

A motilidade e o vigor espermáticos foram observados em microscópio óptico de luz, entre lâmina e lamínula, sob aumento de 40 dioptrias, e a motilidade estimada em porcentagem média de espermatozoides móveis e o vigor em escala de 1-5.

4.2 Determinação da concentração espermática

A concentração espermática foi estimada por meio da utilização de uma câmara hematómica de Neubauer. Para tanto, uma alíquota de 10µL de sêmen *in natura* foi diluída em 990µL de solução formol-citrato (2,9 g de citrato de sódio, 4 mL de solução comercial de formaldeído 35% e água destilada q.s.p. 100 mL), resultando em uma diluição final (fator de diluição) de 1:100 (sêmen:formol-citrato). A concentração foi estimada pela fórmula a seguir:

$$CE = N \times FC;$$

em que:

CE é a concentração espermática (espermatozóides por mm^3);

N é o número de células contadas na câmara de Neubauer.

FC é o fator de correção é dado por:

$$\text{fator de correção (FC)} = (q \times fd) / d;$$

em que:

q = 5, e representa a razão entre o número total de quadriculos da câmara de Neubauer (25) e o número de quadriculos contados (5);

fd é o fator de diluição da alíquota de sêmen (= 1000);

d é a profundidade entre a lamínula e a câmara de Neubauer (= 0,1 mm).

4.3 Tratamentos experimentais

Após calcular a concentração do sêmen, os ejaculados foram diluídos em BTS 5% (m/v) (Beltsville Thawing Solution; Tabela 1), em doses de 500 milhões, 1 bilhão, 1,5 bilhão e 2 bilhões de espermatozóides, em 20 mL de diluente BTS. Todas as doses foram produzidas em “*split sample*”, ou seja, as doses utilizadas para os tratamentos foram produzidas a partir dos mesmos ejaculados. Após a diluição, o sêmen ficou incubado em temperatura ambiente por duas horas, protegido da luz. Após este tempo, as amostras foram

conservadas em geladeira, em temperatura entre 16°-19°C. O sêmen foi avaliado quanto à motilidade, ao vigor e à morfologia, nos tempos de zero (*in natura*), 2 e 24 horas após a diluição.

TABELA 1. Composição química do diluidor BTS.

Constituinte	Quantidade (g)*
Glicose	79,90
Citrato de sódio	12,71
EDTA	2,65
Bicarbonato ácido de sódio	2,65
Cloreto de potássio	1,59
Sulfato de gentamicina	0,50
Total	100,00

* Fonte: Minitub do Brasil Ltda. EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

4.4 Análise morfológica dos espermatozoides

As análises morfológicas espermáticas foram realizadas em microscópio óptico composto, com iluminação episcópica fluorescente (Meiji Techno, PCM Asbestos, modelo ML 6520), pertencente ao Laboratório de Fisiologia e Farmacologia do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras.

Uma alíquota de 30 µL de sêmen *in natura* foi diluída em 500 µL de solução formol-citrato. A seguir, uma fração de, aproximadamente, 10 µL da amostra fixada foi depositada em uma lâmina histológica e coberta por uma lamínula. O exame constituiu da observação da morfopatologia de 100 células

espermáticas focalizadas em diversos campos ao longo de toda a lâmina, conforme esquematizado na Figura 2.

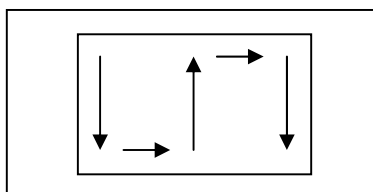


FIGURA 2. Seqüência de campos observados durante a análise morfológica do sêmen. As setas indicam o sentido da avaliação.

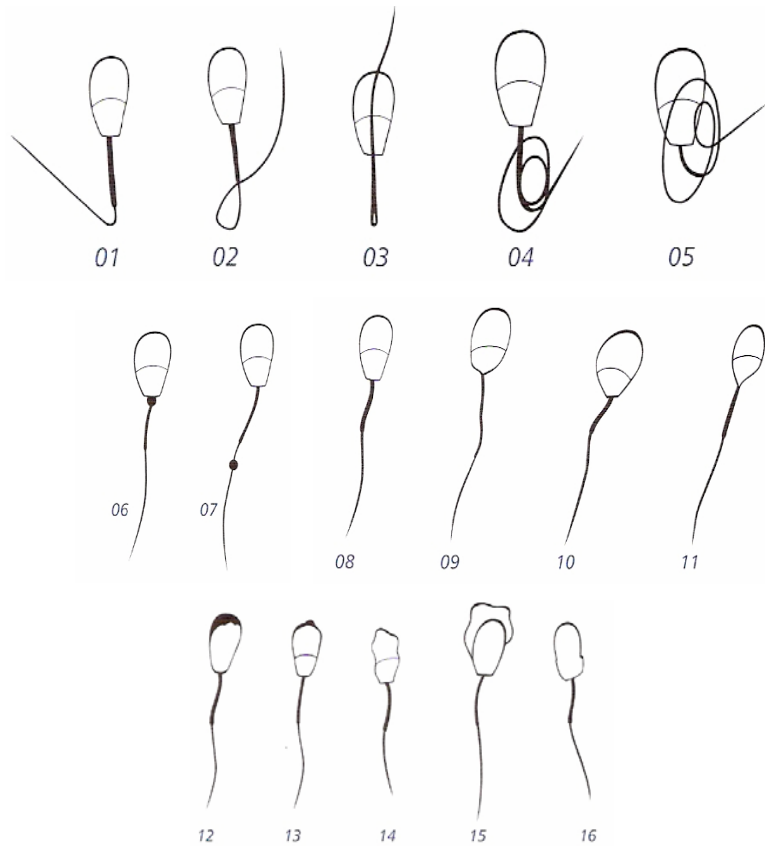
Sob um aumento de 400 dioptrias, foram investigadas as patologias de cabeça, acrossoma, peça intermediária e restante da cauda, conforme resumido na Tabela 2 e apresentado na Figura 3.

TABELA 2. Alterações ocorridas com maior frequência nos espermatozóides do varrão.

Porção acometida	Patologias
Cabeça	Globosa
	Isolada
	Piriforme
Peça intermediária	Gota citoplasmática proximal
Cauda	Dobrada
	Em laço
	Fortemente enrolada
	Gota citoplasmática distal
Acrossoma	Difuso
	Deformado
	Contorno irregular
	Em destacamento, destacado

Fonte: Modificado de Furtado et al. (2006).

Em virtude da gota citoplasmática distal não influenciar ou comprometer o processo de fertilização, esta patologia foi desconsiderada na análise dos dados.



- | | |
|----------------------------------|----------------------------------|
| 01. Cauda dobrada | 09. Cabeça piriforme |
| 02. Cauda em laço | 10. Cabeça globosa |
| 03. Cauda dobrada | 11. Cabeça estreita na base |
| 04. Cauda fortemente enrolada | 12. Acrossoma difuso |
| 05. Cauda fortemente enrolada | 13. Acrossoma deformado |
| 06. Gota citoplasmática proximal | 14. Acrossoma contorno irregular |
| 07. Gota citoplasmática distal | 15. Acrossoma em destacamento |
| 08. Cabeça normal | 16. Acrossoma destacado |

FIGURA 3. Alterações mais observadas na cauda, peça intermediária, cabeça e acrossoma dos espermatozoides (Furtado et al., 2006).

4.5 Tratamentos e realização da inseminação artificial

Após o desmame das fêmeas, foi realizada a detecção do estro, duas vezes por dia (manhã e tarde), pelo reflexo de tolerância ao homem na presença do macho. Após o início do estro, as fêmeas foram distribuídas aleatoriamente, considerando as características citadas anteriormente, em quatro tratamentos. As doses testadas para a IIU foram 500 milhões, 1 bilhão, 1,5 bilhão e 2 bilhões de espermatozoides por dose inseminante (20 mL de diluente).

Foram utilizadas 48 fêmeas distribuídas em quatro tratamentos, representados por 4 graus de diluição. As fêmeas foram inseminadas com pipeta de IA descartável (tubo de polipropileno com esponja de poliuretano) e um cateter semi-rígido de polipropileno, com três milímetros de diâmetro externo e dois milímetros de diâmetro interno (lúmen), o qual desliza internamente à pipeta, estendendo-se 20 cm além das pregas cervicais, alcançando a região da bifurcação dos cornos ou, mesmo, um dos cornos uterinos, permitindo a deposição intra-uterina da dose inseminante (Figura 4).

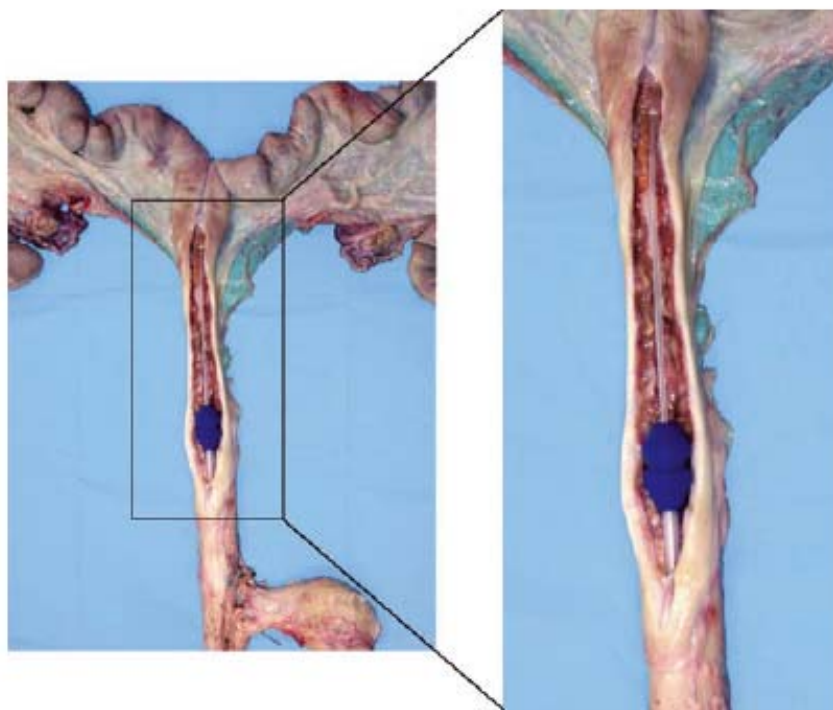


FIGURA 4. Pipeta de inseminação intra-uterina, com cateter semi-rígido (Roca et al., 2006).

A inseminação intra-uterina foi realizada com uma pipeta intra-uterina de borracha, do tipo Verona (Foamtip™ - Minitub) e cada fêmea foi inseminada duas vezes, nos tempos de 24 e 48 horas após a detecção do início do cio.

Todas as inseminações foram realizadas com sêmen armazenado por 24 horas, à temperatura de 16° a 19°C.

Para a realização da inseminação artificial foi utilizado um varrão próximo das gaiolas das fêmeas inseminadas, com contato visual. Foi realizada limpeza prévia da parte externa da vulva com papel-toalha e a pipeta foi

introduzida delicadamente. Após a passagem da pipeta e verificação de que a mesma estava presa à cérvix, foi introduzido o cateter. O sêmen foi acondicionado em bolsas plásticas (blister - GoldenbagTM - IMV), acondicionando-se apenas 20 mL de sêmen em cada blister. Após todo o sêmen ter passado pelo cateter, foram utilizados 5 mL de BTS em temperatura ambiente, para a “limpeza espermática” do cateter, conduzindo os espermatozoides em direção ao útero. Após a inseminação, a pipeta que estava presa às primeiras pregas cervicais permaneceu no trato genital feminino por uma hora, antes de ser retirada, na tentativa de reduzir o refluxo vulvar.

4.6 Diagnóstico de gestação

Foi efetuado o diagnóstico de retorno ao estro a partir dos 18 até 23 dias após a IA, pelo teste de reflexo de tolerância ao homem na presença do macho. O diagnóstico de gestação foi realizado aos 28-30 dias após a IA, por ultrasonografia transcutânea em tempo real, com transdutor setorial de 5MHz (Agroscan - IMV), em todas as fêmeas submetidas à IIU. No parto, foram coletados dados referentes ao tamanho da leitegada (número de leitões nascidos, nascidos vivos, mumificados e natimortos) e peso do leitão ao nascer.

4.7 Delineamento estatístico e análises estatísticas

Foram realizados dois experimentos neste trabalho: o primeiro para avaliar o sêmen utilizado na IIU e o segundo para avaliar as diferentes concentrações utilizadas na IIU, com relação ao desempenho reprodutivo.

4.6.1 Análises espermáticas

Para todas as variáveis relacionadas ao macho foi adotado o modelo estatístico em delineamento em blocos casualizados com parcela subdividida no tempo, de acordo com o modelo a seguir:

$$Y_{ijk} = \mu + C_i + B_j + e_{ij} + T_k + (CT)_{ijk} + e_{ijk}$$

em que:

Y_{ijk} é a observação referente ao tempo k , na concentração i , no bloco j ;

μ é a constante associada a cada observação;

C_i é o efeito da concentração espermática i , sendo $i= 1, 2, 3, 4$;

B_j é o efeito do bloco j , sendo $j=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8$;

e_{ij} é o erro experimental associado às concentrações, independente, com distribuição normal de média 0 e variância σ_a^2 ;

T_k é o efeito do tempo k , sendo $k=1, 2$;

$(CT)_{ijk}$ é o efeito da interação entre a concentração espermática i e o tempo k ,

e_{ijk} é o erro experimental associado à análise da unidade experimental obtido para o sêmen pela concentração i , no tempo k , no bloco j , considerando normal e independentemente distribuído com média 0 e variância σ^2 .

Adotou-se, neste experimento, um esquema fatorial 4 x 2 (quatro diluições e dois tempos de avaliação – após a diluição e após o resfriamento), perfazendo oito tratamentos mais um tratamento adicional (avaliação do sêmen *in natura*), com oito repetições (animais experimentais). A unidade experimental foi representada por cinco doses inseminantes.

Os dados foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste Tukey e pelo teste Dunnett, quando comparadas ao tratamento controle. Os parâmetros vigor espermático e porcentagem de espermatozoides anômalos foram submetidos à transformação de dados (raiz quadrada) para a obtenção da normalidade residual. Todas as variáveis foram analisadas com o auxílio do programa Statistical Analysis System (SAS, 1995).

4.6.2 Análises das técnicas de inseminação artificial

Para todas as variáveis relacionadas à fêmea, foi adotado o modelo estatístico em delineamento em blocos casualizados, como o modelo a seguir:

$$Y_{ij} = \mu + C_i + B_j + e_{ij}$$

em que:

Y_{ij} é a observação de cada unidade experimental obtida pela concentração i , no bloco j ;

μ é a constante associada a cada observação

C_i é o efeito da concentração espermática i , sendo $i=1, 2, 3, 4$;

B_j é o efeito do bloco j , sendo $j=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12$;

e_{ij} é o erro experimental associado à análise da unidade experimental obtida com a concentração i , no bloco j , considerando normal e independentemente distribuído com média 0 e variância σ^2 .

Adotou-se, neste experimento, um delineamento com quatro graus de concentração e, com 48 animais distribuídos em 4 tratamentos, com 12 blocos (fêmeas) e um animal por parcela experimental. As fêmeas foram separadas em blocos de acordo com a ordem de parto e o tamanho de leitegada anterior.

Os parâmetros nascidos totais, nascidos vivos, natimortos, mumificados e peso ao nascer do leitão foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas entre si. Todas as variáveis foram analisadas com o auxílio do programa Statistical Analysis System (SAS, 1995).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Motilidade e vigor espermáticos

Os valores médios da motilidade espermática do sêmen suíno avaliado estão apresentados na Tabela 3. Observou-se que apenas a concentração de 500×10^6 espermatozoides por dose inseminante apresentou menor valor ($P < 0,05$) sobre a motilidade (56,9% e 39,9%, nos tempos de 2 e 24 horas, respectivamente) em relação às demais doses, as quais não diferiram entre si. Segundo Silveira & Iais (1999), a avaliação da motilidade e do vigor espermáticos é um procedimento válido para avaliar a capacidade de fecundação do espermatozoide, desprezando-se ejaculados com motilidade abaixo de 60% e vigor abaixo de 3, pois estes apresentarão espermatozoides com baixa capacidade de fecundação. Entretanto, no presente experimento, as doses inseminantes com concentração de 500×10^6 espermatozoides utilizadas apresentaram valores médios de motilidade inferiores a 60%, e as doses utilizadas na IIU apresentavam vigor médio de 1,9.

Em todas as concentrações, observou-se queda ($P < 0,05$) da motilidade espermática, após armazenamento em temperatura de 16°-19°C, por 24 horas. A concentração de 500×10^6 espermatozoides apresentou motilidade inferior, diferindo das demais ($P < 0,05$), para ambos os tempos. Apenas as concentrações de 1500 e 2000 $\times 10^6$ espermatozoides após a diluição (2 horas) não diferiram ($P < 0,05$) do valor da motilidade espermática *in natura*.

De Ambrogi et al. (2006) observaram que a percentagem de motilidade das células espermáticas diminui com relação ao tempo de armazenamento, demonstrando que o armazenamento de sêmen a 17°C, por 96 horas, pode afetar

características relevantes para a fertilização, além da motilidade, como integridade de membrana e estabilidade da cromatina. Foxcroft (2002) afirma que a avaliação da motilidade após a diluição pode ser uma forma de identificar animais superiores em termos de fertilidade. Dessa forma, este parâmetro sofre influências individuais acentuadas.

Segundo Bortolozzo et al. (2005), a avaliação da motilidade por períodos prolongados parece ser importante, uma vez que as diluições do sêmen são extremamente altas e a presença de plasma seminal é praticamente nula. Pode-se inferir que os espermatozoides da menor concentração utilizada neste estudo foram afetados, devido ao maior grau de diluição.

TABELA 3. Motilidade espermática (%) do sêmen suíno avaliado *in natura*, após diluição (2 horas) e após 24 horas de armazenamento a 16°-19°C.

	Concentração (x 10 ⁶ sptz / dose inseminante)				Média
	500	1000	1500	2000	
2 horas	56,9 Aa*	70,0 Ab*	74,4 Ab	74,4 Ab	68,9
24 horas	39,9 Ba*	60,3 Bb*	63,5 Bb*	65,6 Bb*	57,3
<i>In natura</i>	83,8				
CV (%)	8,99				

Médias seguidas de diferentes letras minúsculas na linha diferem, pelo teste Tukey (P<0,05)

Médias seguidas de diferentes letras maiúsculas na coluna diferem, pelo teste F (P<0,05)

* Médias diferem do sêmen *in natura*, pelo teste Dunnet (P<0,05)

Os valores médios do vigor espermático no sêmen suíno estão apresentados na Tabela 4. O vigor espermático do sêmen *in natura* foi 3, numa escala de 1 a 5, e as concentrações, para ambos os tempos, apresentaram valores inferiores (P<0,05). O vigor diminuiu com a redução da temperatura, com a média do vigor após 24 horas armazenado em temperatura de 16°-19°C sendo inferior (P<0,05) se comparado com o tempo de 2 horas armazenado em temperatura ambiente (1,9 e 2,4 respectivamente).

TABELA 4. Vigor espermático do sêmen suíno avaliado *in natura*, após diluição (2 horas) e após 24 horas de armazenamento a 16°-19°C.

	Concentração (x 10 ⁶ sptz / dose inseminante)				Média
	500	1000	1500	2000	
2 horas	2,1 *	2,3 *	2,6 *	2,5 *	2,4 a
24 horas	1,8 *	1,8 *	1,9 *	2,1 *	1,9 b
<i>in natura</i>	3,0				
CV (%)	8,85				

Médias seguidas de diferentes letras minúsculas na coluna diferem, pelo teste Tukey (P<0,05)
 * Médias diferem do sêmen *in natura*, pelo teste Dunnet (P<0,05)

5.2 Morfologia espermática

Não foi verificada diferença (P>0,05) entre as quatro concentrações utilizadas para a IIU sobre as patologias das células (Tabela 5). Os valores observados apresentam diferenças (P<0,05) entre as concentrações para a IIU e o sêmen *in natura*, com relação à ocorrência de patologias, para ambos os tempos, exceto com a concentração de 1500 x 10⁶ espermatozóides após a diluição (2 horas) que teve valor similar ao sêmen *in natura*. Provavelmente, o espermatozóide é afetado pelas flutuações de temperatura, pH ou de osmolaridade durante a diluição ou no armazenamento.

TABELA 5. Total de células anômalas (%) do sêmen suíno avaliado *in natura*, após diluição (2 horas) e após 24 horas de armazenamento a 16°-19°C.

	Concentração (x 10 ⁶ spz / dose inseminante) ¹				Média
	500	1000	1500	2000	
2 horas	7,4 *	9,0 *	4,9	6,5 *	6,9
24 horas	7,7 *	7,1 *	7,9 *	7,6 *	7,6
<i>In natura</i>	4,3				
CV (%)	16,12				

¹ Não houve diferenças pelo teste F (P>0,05)

* Médias diferem do sêmen *in natura*, pelo teste Dunnet (P<0,05)

O exame de morfologia espermática é utilizado como indicativo de potencial fecundante do ejaculado, pois as alterações interferem na capacidade de movimentação e fecundação do espermatozóide, de acordo com a localização do defeito (Furtado et al., 2006). Segundo Scheid et al. (1993), os limites máximos observados no ejaculado suíno, para se obter uma boa fertilização, são assim estipulados: alterações de cabeça (5%), acrossoma (5%), peça intermediária (5%), alterações de cauda (10%) e totais (20%).

Entre as alterações, foram analisadas as patologias da peça intermediária (gota citoplasmática proximal) e da cauda, com os resultados apresentados nas Tabelas 6, 7 e 8. Dentre as amostras analisadas nenhuma apresentou alteração de cabeça e acrossoma. Isso ocorreu, possivelmente, porque os machos utilizados no presente trabalho são animais selecionados de acordo com a qualidade espermática, sendo descartados quando os mesmos apresentam alterações espermáticas acima do limite preconizado.

A patologia de gota citoplasmática distal não foi considerada na análise dos dados. Segundo Scheid et al. (1993) e Silveira & Iais (1999), as alterações de gota citoplasmática distal não representam alterações na fertilidade do sêmen do suíno.

TABELA 6. Patologias espermáticas examinadas no sêmen *in natura* e diluído de varrões.

Porção acometida	Porcentagem	Patologias
Peça intermediária	31,49%	Gota proximal
Cauda	68,51%	Gota distal, em laço, dobrada

As alterações de cabeça e de peça intermediária são consideradas primárias, ou seja, originadas durante o processo de formação dos espermatozoides. Por outro lado, as alterações de cauda espermática são secundárias, podendo refletir na taxa de fertilização. As alterações de cauda foram mais elevadas, tendo, em média, todas as amostras de ejaculados apresentado alterações dentro do limite máximo preconizado (10%).

TABELA 7. Alterações de gota citoplasmática proximal (%) do sêmen suíno avaliado *in natura*, após diluição (2 horas) e após 24 horas de armazenamento a 16°-19°C.

	Concentração (x 10 ⁶ spz / dose inseminante) ¹				Média
	500	1000	1500	2000	
2 horas	2,25	2,75	1,88	2,00	2,22
24 horas	2,58	1,85	2,23	2,55	2,30
Média	2,42	2,30	2,06	2,28	
<i>In natura</i>	2,75				
P =	0,9749				

¹ Não houve diferenças pelo teste qui-quadrado (P>0,05)

Não houve diferença com relação à porcentagem de alterações na peça intermediária entre os cinco tratamentos utilizados (P>0,05) e todos os valores foram inferiores ao limite preconizado (5%).

Durante a espermatogênese, fisiologicamente, ocorre a formação de uma gota junto ao colo. Esta estrutura é um resíduo do processo de formação do espermatozóide, conhecido como gota citoplasmática proximal. Ao longo do trânsito espermático pelo epidídimo, a gota migra para o final da peça intermediária, nomeada de gota citoplasmática distal, até se desprender da peça intermediária. A coleta excessiva dos machos pode levar a um aumento no percentual de gotas e a redução do número de coletas minimiza sua ocorrência. Estresse térmico, quadros febris e alterações nutricionais podem resultar no aumento de espermatozoides com esta alteração (Furtado et al., 2006). Segundo Scheid et al. (1993), a frequência de coletas nos reprodutores é de duas coletas por semana, sendo uma coleta a cada 3,5 dias. As coletas neste experimento foram realizadas entre intervalos de 4-6 dias, para cada varrão.

TABELA 8. Alterações de cauda (%) do sêmen suíno avaliado *in natura*, após diluição (2 horas) e após 24 horas de armazenamento a 16°-19°C.

	Concentração (x 10 ⁶ spz / dose inseminante) ¹				Média
	500	1000	1500	2000	
2 horas	5,13	6,25	3,00	4,50	4,72
24 horas	5,40	5,23	5,65	4,95	5,31
Média	5,27	5,74	4,33	4,73	
<i>In natura</i>	1,50				
P =	0,9796				

¹ Não houve diferenças pelo teste qui-quadrado (P>0,05)

Não houve diferença (P>0,05) quanto à porcentagem de alterações de cauda entre as quatro concentrações utilizadas na IIU. Os dados demonstram que a amostra do sêmen *in natura* teve um valor mínimo e todos os dados analisados foram inferiores ao limite máximo preconizado (10%).

As alterações principais de cauda analisadas neste experimento foram as patologias de cauda em laço, dobrada e fortemente enrolada. Estas anormalidades podem ser resultadas de choque térmico durante a diluição e a

coleta. O choque térmico durante a coleta e a diluição é uma das causas mais comuns de formação de cauda enrolada ou dobrada (Furtado et al., 2006). Isto permite dizer que o procedimento utilizado no resfriamento do sêmen foi eficaz na prevenção do aparecimento de alterações da cauda.

Gadea (2005) afirma que a morfologia espermática é um parâmetro que está relacionado à fertilidade. Na análise espermática, esse parâmetro fornece informações sobre o “status” da espermatogênese, facilita a seleção de reprodutores para os programas de IA e, também, fornece informações complementares sobre estresse sofrido pelos reprodutores suínos durante sistemas intensivos de colheitas seminais.

5.3 Desempenho reprodutivo após a inseminação intra-uterina (IIU)

Das 48 fêmeas, apenas uma (2,1%) apresentou resistência à introdução do cateter, qual seja, a que receberia a concentração de 2 bilhões de espermatozoides, sendo possível a introdução do cateter em 97,9% das fêmeas. Esta dificuldade para a introdução do cateter pode estar associada a falhas na detecção do estro nas fêmeas, com detecção tardia e, no momento da inseminação a fêmea, não mais estava no estro. Watson & Behan (2002) utilizaram um cateter com 2 mm de diâmetro interno; o cateter pôde ser introduzido em 46 das 51 fêmeas (90,2%), sem dificuldades. Dallanora et al. (2003) obtiveram 100% de sucesso na passagem da pipeta, totalizando 268 fêmeas inseminadas com pipeta comercial especificamente desenvolvida para a prática da IIU.

O tempo médio para a deposição da dose inseminante foi de 1 minuto e 51 segundos (amplitude de 20 segundos a 4 minutos). Watson & Behan (2002) relatam que o tempo de deposição do sêmen na técnica de IIU foi de menos de 1 minuto. Roca et al. (2003), utilizando uma pipeta com cateter flexível, obtiveram

sucesso, durante a passagem através da cérvix, em 94% das fêmeas, e o tempo gasto para cada inseminação foi de 4,4 minutos (amplitude de 3 a 6 minutos).

A repetição de cio após a inseminação ocorreu em 3 das 47 fêmeas inseminadas (6,3%). O aborto ocorreu também em 3 das 47 fêmeas inseminadas (6,3%). A taxa de parto foi de 87, 2% (Tabela 9). A concentração de 500×10^6 de espermatozóides por dose inseminante teve 100% de taxa de parto, sem repetição de cio ou aborto. Nas demais concentrações, o número de fêmeas que repetiram cio e abortaram foi igual. Isso indica que a deposição intra-uterina de 500×10^6 de espermatozóides permitiu a formação eficiente do reservatório espermático na junção útero-tubárica e adequada fecundação, mesmo com a motilidade das doses inseminantes inferiores a 60%, contrapondo-se a Johnson et al. (2000) e Silveira & Iais (1999), que relataram o contrário.

TABELA 9. Desempenho de cobertura das fêmeas inseminadas com a técnica intra-uterina.

	IIU				Total
	Dose ($\times 10^6$ espermatozóides)				
	500	1000	1500	2000	
Repetição de estro (%)	0,0	8,3%	8,3%	9,1%	6,3%
n	(0/12)	(1/12)	(1/12)	(1/11)	(3/47)
Aborto (%)	0,0	8,3%	8,3%	9,1%	6,3%
n	(0/12)	(1/12)	(1/12)	(1/11)	(3/47)
Taxa de parto (%)	100%	83,4%	83,4%	81,8%	87,2%
N	(12/12)	(10/12)	(10/12)	(9/11)	(41/47)

A taxa de prenhez observada por Wolken (2001), citado por Dallanora (2004), foi relativamente baixa (77,3%), com dose de 500 milhões de espermatozóides em 20 mL, se comparada com a taxa de prenhez obtida neste trabalho (100%). Mezalira et al. (2003) utilizaram IIU e obtiveram taxa de

prenhez de 85,5%, com 500 milhões de espermatozóides em 20 mL, com redução significativa para 77,1%, quando a dose continha 250 milhões de espermatozóides. Martinez et al. (2002) obtiveram taxa de parto de 76,2% e 82,9%, utilizando 50 e 150 milhões de espermatozóides em 5 mL de diluente, com inseminação única.

As taxas de parto das concentrações de 1 e 2 bilhões de espermatozóides foram de 83,4% e 81,8%, respectivamente. Os valores obtidos por Watson & Behan (2002) foram de 86,9% e 92,5%, para 1 e 2 bilhões de espermatozóides respectivamente. Dallanora (2004) utilizou a concentração de 1,5 bilhão de espermatozóides com a técnica de IIU e obteve as taxas de retorno ao estro e parto de 3,6% e 92,8%, respectivamente. Os valores observados pelo autor foram melhores que os do presente trabalho, que foram de 8,3% e 83,4%. As taxas de retorno ao estro e de parto obtidas por Dallanora (2004) podem estar relacionadas com a elevada frequência de inseminações por fêmea num único estro.

Mezalira et al. (2003) realizaram a técnica de deposição intra-uterina utilizando concentrações de 500 e 250 milhões e observaram que a taxa de prenhez foi reduzida significativamente de 85,5% para 77,1%, com a diminuição da concentração de espermatozóides na dose inseminante.

Os resultados obtidos com relação à leitegada estão apresentados na Tabela 10. Os dados demonstram que, com relação ao número de nascidos totais e nascidos vivos, as concentrações utilizadas na IIU não diferiram entre si ($P>0,05$).

TABELA 10. Resultados com relação à leitegada (nascidos totais – NT, nascidos vivos – NV, natimortos – NATI, mumificados – MUMIF e a média do peso dos leitões ao nascer – PN) nos quatro graus de concentração utilizados na IIU e no controle.

Dose (x 10 ⁶)	NT ¹	NV ¹	PN ¹	NATI ¹	MUMIF ¹
500	11,1	9,9	1,65	0,67	0,50
1000	10,7	9,4	1,71	1,00	0,30
1500	11,1	10,1	1,64	0,70	0,30
2000	9,67	8,7	1,57	0,89	0,11

¹ Médias não diferem entre si, nas colunas, pelo teste Tukey (P>0,05).

Os valores obtidos utilizando as concentrações de 1 e 2 bilhões de espermatozoides para tamanho da leitegada foram de 10,7 e 9,67 leitões, e nascidos vivos 9,4 e 8,7, respectivamente. Watson & Behan (2002) encontraram valores, para nascidos totais de 12,1 e 12,3, e nascidos vivos, 10,9 e 10,8, para 1 e 2 bilhões de espermatozoides, respectivamente.

Dallanora (2004) obteve 11,6 leitões nascidos utilizando a concentração de 1,5 bilhão de espermatozoides com a técnica de IIU, valor semelhante ao observado no presente trabalho (11,1 leitões).

Com relação do peso ao nascimento do leitão, não houve diferença entre os valores apresentados (P>0,05).

Com relação ao número de natimortos e mumificados, os valores não diferiram entre nenhuma das doses (P>0,05) e estão dentro dos preconizados tanto para natimortos (0,67 – 1 leitão por leitegada, ou 4,8% a 9%) quanto para mumificados (0,11 – 0,58 leitão por leitegada, ou 1,1% a 4,5%), para ambas as técnicas utilizadas na deposição do sêmen. A taxa aceitável de natimortos para as granjas tecnificadas é da ordem de 5% a 7%, tendo sido observados, em avaliações mais recentes realizadas por Borges et al. (2003) e Schneider et al. (2001), citados por Wentz et al. (2006), valores de 5% a 9,7%.

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

A extensão das perdas fetais que culminam em mumificados é da ordem de 0,5% – 1,5%, em média, por leitegada, embora esta realidade, atualmente, possa ser completamente diferente, como mostram os trabalhos de avaliação de mumificados e que observaram que as taxas podem variar entre as granjas de 2,3% a 5,8% (Wentz et al., 2006). Estes autores sugerem que existem duas causas principais prováveis para a ocorrência de mumificação fetal: a falta de espaço uterino, com descolamento precoce de placenta e doenças de caráter progressivo no útero, capazes de causar a morte de vários fetos na mesma leitegada. Estes autores também relatam que a mortalidade fetal em suínos, principalmente a mumificação, tem aumentado, devido ao aumento na taxa de ovulação e provável limitação da capacidade uterina. O tamanho da leitegada também pode ser considerado um fator de risco para mumificados; a taxa de mumificados aumenta com o aumento do tamanho da leitegada. A ordem de parto não influenciou sobre a taxa de mumificação fetal (Wentz et al., 2006).

Não foi observada correlação entre as análises espermáticas e os desempenhos reprodutivos das diferentes doses utilizadas na técnica de IIU. Todos os tratamentos apresentaram um bom desempenho reprodutivo, entretanto, com a utilização da dose inseminante de 500 milhões, que apresentou

menor motilidade, demonstrou valor superior de taxa de parto, se comparado com os demais tratamentos. O uso dos resultados deste experimento deve ser feito com bastante cautela.

6 CONCLUSÕES

Nas condições em que o experimento foi realizado, pôde-se concluir que

1. o sêmen diluído apresentou redução progressiva da qualidade com a diminuição da temperatura e com o tempo de armazenamento em temperaturas baixas;
2. a utilização de 500×10^6 espermatozóides em 20 mL de diluente, com inseminação artificial intra-uterina, permitiu a obtenção de 100% de taxa de parto, e tamanho de leitegada similar, se comparada com os demais tratamentos;
3. a inseminação artificial intra-uterina permitiu uma redução média de 85% do número de espermatozóides e de 80% de volume de diluente por dose inseminante.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BELSTRA, B. A. Review: intrauterine (transcervical) and fixed-time artificial insemination in swine. **Annual Swine Report**, 2002. Disponível em <<http://www.mark.asci.ncsu.edu/SwineReports/>>. Acesso em: 25 ago. 2004.

BENNEMANN, P. E.; MILBRADT, E.; DIEHL, G. N.; WENTG, I.; BORTOLOZZO, F. P. Desempenho reprodutivo de fêmeas suínas submetidas à inseminação intra-uterina com 1 e 2×10^9 espermatozoides em diferentes intervalos pré-ovulatórios. In: CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 11., 2003, Goiânia, **Anais...** Goiânia, 2003. p. 211-212.

BORTOLOZZO, F. P.; MELLAGI, A. P. G.; WENTG, I.; BORTOLOZZO, F. P.; DALLANORA, D. Mecanismos de proteção no útero de porcas no período pré- e pós- cobertura e transporte espermático no trato genital feminino. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE SUINOCULTURA, 3., 2006, Foz do Iguaçu, **Anais...** Foz do Iguaçu, 2006. p. 289-301.

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

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

DALLANORA, D.; MEZALIRA, A.; KATZER, L. H.; BERNARDI, M. L.; BORTOLOZZO, F. P.; WENTZ, I. Desempenho reprodutivo de fêmeas suínas inseminadas com deposição intra-uterina de sêmen e reduzido número de espermatozoides. In: CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 11., 2003, Goiânia, **Anais...** Goiânia, 2003. p. 213-214.

DE AMBROGI, M.; BALLESTER, J.; SARAIVA, F.; CABALLERO, I.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN M.; ANDERSSON, M.; RODRIGUEZ-

MARTINEZ, H. Effect of storage in short- and long-term commercial semen extenders on the motility, plasma membrane and chromatin integrity of boar spermatozoa. **International Journal of Andrology**, Oxford, v. 26, n.5, p. 543-552, Oct. 2006.

FOXCROFT, G. R. Melhorando os resultados da inseminação artificial e monta natural. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE SUINOCULTURA, 2., 2002, Foz do Iguaçu, Brasil. **Anais...** Foz do Iguaçu, 2002. p. 25-37.

FURTADO, C. S.; MELLAGI, A. P. G.; VARGAS, A. J.; BORTOLOZZO, F. P.; WENTZ, I. Aspectos relevantes na avaliação da morfologia espermática do suíno. **Suinocultura em Foco**, Porto Alegre, n. 17, p.04-05, 2006.

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

GIL, J.; TORTADES, T. M.; ALEVIA, A. Inseminación post-cervical. **Porcinocultura.com**. 2001. Disponível em: <<http://www.porcinocultura.com>>. Acesso em: 25 ago. 2004.

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

KRUEGER, C.; RATH, D. Intrauterine insemination in sows with reduced sperm number. **Reproduction, Fertility, Development**, Coling Wood, v. 12, n. 1/2, p. 113-117, 2000.

KRUEGER, C.; RATH, D.; JOHNSON, L. A. Low dose insemination in synchronized gilts. **Theriogenology**, Woburn, v. 52, n. 8, p. 1363-1373, Dec. 1999.

LEVIS, D.G. New reprotuctive technologies for the AI industry. **Ohio Pork Industry Center**. 2002. Disponível em: <<http://www.nsif.com/Conferences/>>. Acesso em: 26 ago. 2004.

LEVIS, D. G.; BURROUGHS, S.; WILLIAMS, S. Use of intrauterine insemination of pigs: pros, cons and economics. **Ohio Pork Industry Center**, 2002. Disponível em: <<http://www.porkinfo.osu.edu>>. Acesso em: 20 ago. 2004.

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

MARTINEZ, E. A.; VAZQUEZ, J. M.; ROCA, J.; LUCAS, X.; GIL, M. A.; PARRILLA, I.; VAZQUEZ, J. L.; DAY, B. N. Minimum number of spermatozoa required for normal fertility after deep intrauterine insemination in non-sedated sows. **Reproduction**, Cambridge, v.123, n. 1, p. 163-170, Jan. 2002.

MARTINEZ, E. A.; VAZQUEZ, J. M.; ROCA, J.; LUCAS, X.; GIL, M. A.; PARRILLA, I.; VAZQUEZ, J. L.; DAY, B. N. Successful non-surgical deep intrauterine insemination with a small numbers of spermatozoa in sows. **Reproduction**, Cambridge, v. 122, n. 2, p. 289-296, Aug. 2001.

MEZALIRA, A.; DALLANORA, D.; SCHMIDT, A. C. T.; BERNARDI, M. L.; WENTZ, I.; BORTOLOZZO, F. P. Inseminação intra-uterina em fêmeas suínas com redução no volume e número de espermatozoides. In: CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 11., 2003, Goiânia. **Anais...** Goiânia, 2003. p. 217-218.

NASCIMENTO, E. F.; SILVA FILHO, J. M.; VALE FILHO, V. R.; NASCIMENTO, J. K.; MELLO, M. I. V. Efeitos do diluidor e do resfriamento do sêmen sobre algumas características espermáticas de varrões. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 50, n. 2, p. 141-146, 1998.

ROCA, J.; CARVAJAL, G.; LUCAS, X.; VAZQUEZ, J. M.; MARTINEZ, E. A. Fertility of weaned sows after deep intrauterine insemination with a reduced number of frozen-thawed spermatozoa. **Theriogenology**, Woburn, v. 60, n. 1, p.77-87, June 2003.

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

SAS. SAS/STAT Software. **Guide for personal computers**. Cary, 1995.

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

SILVEIRA, P. R.; IAIS, I. **Curso de inseminação artificial em suínos**. Concórdia: CNPSA/EMBRAPA, 1999. 19 p.

VAZQUEZ, J. M.; MARTINEZ, E. A.; PARRILLA, I.; ROCA, J.; GIL, M. A.; VAZQUEZ, J. L. Birth of piglets after deep intrauterine insemination with flow cytometrically sorted boar spermatozoa. **Theriogenology**, Woburn, v. 59, n. 7, p. 1605-1614, Apr. 2003.

VIDOR, R. M.; POSTAL, A. T.; BORTOLOZZO, F. P.; WENTZ, I. Transporte espermático e formas de eliminação do sêmen do trato genital feminino. **Suinocultura em Foco**, Porto Alegre, n. 2, p.6-7, jan. 2002.

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

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

ANEXOS

Tabela 1A. Análise de variância da motilidade espermática sobre a concentração espermática e o tempo de armazenamento das concentrações utilizadas na IIU.....	52
Tabela 2A. Análise de variância do vigor espermático ¹ sobre a concentração espermática e o tempo de armazenamento das concentrações utilizadas na IIU.....	53
Tabela 3A. Análise de variância da morfologia ¹ espermática sobre a concentração espermática e o tempo de armazenamento das concentrações utilizadas na IIU.....	54
Tabela 4A. Análise de variância do número de leitões nascidos sobre as concentrações utilizadas na técnica de inseminação artificial intra-uterina.	55
Tabela 5A. Análise de variância do número de leitões nascidos vivos sobre as concentrações utilizadas na técnica de inseminação artificial intra-uterina.	56
Tabela 6A. Análise de variância do peso ao nascimento dos leitões sobre as concentrações utilizadas na técnica de inseminação artificial intra-uterina.	57

Tabela 1A. Análise de variância da motilidade espermática sobre a concentração espermática e o tempo de armazenamento das concentrações utilizadas na IIU.

FV	GL	SQ	QM	F	P>F
Bloco	7	1685,359	240,7656	13,46847	0,0000
Concentração (C)	3	4841,797	1613,932	90,28366	0,0000
Adicional	1	3492,46	3492,46	195,3688	0,0000
erro A	28	500,5347	17,87624		
Tempo (T)	1	2150,641	2150,641	58,86766	0,0000
T*C	3	164,9219	54,97396	1,504756	0,2349
<i>C dentro T1</i>	3	1646,09375	548,6979	15,019	0,0000
<i>C dentro T2</i>	3	3360,625	1120,208	30,663	0,0000
<i>T dentro C1</i>	1	1156,00	1156,0	31,642	0,0000
<i>T dentro C2</i>	1	380,250	380,25	10,408	0,0032
<i>T dentro C3</i>	1	473,0625	473,0625	12,949	0,0012
<i>T dentro C4</i>	1	306,250	306,250	8,383	0,0073
erro B	28	1022,938	36,53348		
CV 1 (%) =	8,63				
CV 2 (%) =	8,99				

Tabela 2A. Análise de variância do vigor espermático¹ sobre a concentração espermática e o tempo de armazenamento das concentrações utilizadas na IIU.

FV	GL	SQ	QM	F	P>F
Bloco	7	0,145692	0,020813	1,991243	0,0922
Concentração (C)	3	0,02874	0,00958	0,91654	0,4456
Adicional	1	0,389853	0,389853	37,29816	0,0000
erro A	28	0,292666	0,010452		
Tempo (T)	1	0,283618	0,283618	18,84277	0,0002
T*C	3	0,019144	0,006381	0,423958	0,7373
<i>C dentro T1</i>	3	0,089746	0,029915	1,987	0,1374
<i>C dentro T2</i>	3	0,055825	0,018608	1,236	0,3134
<i>T dentro C1</i>	1	0,048175	0,048175	3,201	0,0844
<i>T dentro C2</i>	1	0,00258	0,00258	0,171408	0,6820
<i>T dentro C3</i>	1	0,00243	0,00243	0,161442	0,6909
<i>T dentro C4</i>	1	0,042168	0,042168	2,801	0,1053
erro B	28	0,421451	0,015052		
CV 1 (%) =	5,69				
CV 2 (%) =	8,85				

¹ Opção de transformação: Raiz quadrada de Y + 1,0 - SQRT (Y + 1,0)

Tabela 3A. Análise de variância da morfologia¹ espermática sobre a concentração espermática e o tempo de armazenamento das concentrações utilizadas na IIU.

FV	GL	SQ	QM	F	P>F
Bloco	7	71,644	10,23486	34,75185	0,0000
Concentração (C)	3	0,500132	0,166711	0,566056	0,6419
Adicional	1	2,702201	2,702201	9,175163	0,0052
erro A	28	8,246353	0,294513		
Tempo (T)	1	0,224548	0,224548	1,346079	0,2558
T*C	3	0,706784	0,235595	1,4123	0,2600
<i>C dentro T1</i>	<i>3</i>	<i>1,032219</i>	<i>0,344073</i>	<i>2,063</i>	<i>0,1266</i>
<i>C dentro T2</i>	<i>3</i>	<i>0,174697</i>	<i>0,058232</i>	<i>0,349</i>	<i>0,7894</i>
<i>T dentro C1</i>	<i>1</i>	<i>0,032841</i>	<i>0,032841</i>	<i>0,197</i>	<i>0,6607</i>
<i>T dentro C2</i>	<i>1</i>	<i>0,136057</i>	<i>0,136057</i>	<i>0,816</i>	<i>0,3742</i>
<i>T dentro C3</i>	<i>1</i>	<i>0,656885</i>	<i>0,656885</i>	<i>3,938</i>	<i>0,0571</i>
<i>T dentro C4</i>	<i>1</i>	<i>0,105550</i>	<i>0,105550</i>	<i>0,633</i>	<i>0,4330</i>
erro B	28	4,670858	0,166816		
CV 1 (%) =	17,28				
CV 2 (%) =	16,12				

¹ Opção de transformação: Raiz quadrada de Y + 1,0 - SQRT (Y + 1,0)

Tabela 4A. Análise de variância do número de leitões nascidos sobre as concentrações utilizadas na técnica de inseminação artificial intra-uterina.

FV	GL	QM	P>F
BLOCO	11	14,8155	0,1666
DOSES	3	8,3633	0,4713
NTA	1	37,8852	0,0563
Resíduo	37	58,7919	
CV (%)	27,8		

Tabela 5A. Análise de variância do número de leitões nascidos vivos sobre as concentrações utilizadas na técnica de inseminação artificial intra-uterina.

FV	GL	QM	P>F
BLOCO	11	14,9808	0,1097
DOSES	3	5,1667	0,6249
NVA	1	14,6903	0,2031
Resíduo	37	76,9711	
CV (%)	29,3		

Tabela 6A. Análise de variância do peso ao nascimento dos leitões sobre as concentrações utilizadas na técnica de inseminação artificial intra-uterina.

FV	GL	QM	P>F
BLOCO	11	0,0477	0,4060
DOSES	3	0,0395	0,4545
PNA	1	0,1208	0,1074
Resíduo	37	0,1300	
CV (%)	12,9		