



Até onde é possível reduzir o número de espermatozoides empregados na inseminação artificial intra-cervical em suínos sem comprometer a fertilidade ?

How far is it possible to reduce the number of spermatozoa after intra-cervical insemination in swine without compromising fertility ?

Fernando Pandolfo Bortolozzo, Ana Maria Groehs Goldberg & Ivo Wentz

INTRODUÇÃO

O emprego da inseminação artificial (IA) em suínos tem aumentado consideravelmente nas duas últimas décadas. Entretanto, comercialmente, pouca alteração tem sido observada no número de doses possíveis de serem produzidas a partir de um ejaculado. Utilizando a técnica tradicional de IA, com a deposição intra-cervical da dose de sêmen, a indústria suína tem empregado 2,5-4 bilhões de espermatozoides por dose, depositados duas a três vezes ao longo do estro. Isso limita o número de doses produzidas em média por ejaculado a, aproximadamente, 20-25 [19]. Considerando que uma matriz é inseminada 2,4-2,6 vezes ao ano, com uma média de 2,2 a 2,7 doses por estro, cada fêmea necessitará ao redor de 5 a 7 doses de sêmen ao ano. Nesse sentido, se forem empregadas doses entre 2,5 e 4 bilhões de espermatozoides, cada matriz necessitaria de 12,5 a 28 bilhões de espermatozoides ao ano. Ou seja, utilizando o conhecimento que se tem no momento, observam-se situações em que há uma variação de até 125% na demanda necessária de sêmen. Para aumentar a eficiência no número de espermatozoides de cachos de mérito genético alto, vários procedimentos podem ser empregados, como alterações na estratégia de IA (reduzindo o número de IA por estro) e reduções no número de espermatozoides por doses [7, 19]. A redução de espermatozoides pode ser obtida empregando novas técnicas de deposição do sêmen no trato genital feminino. Segundo Krueger e Rath [16], é possível reduzir em até 100 vezes o número de espermatozoides empregados em uma dose tradicional se a deposição for feita de forma cirúrgica próximo à junção útero-tubárica. Nesse sentido, foram aprimoradas algumas técnicas que permitem a deposição do sêmen no interior do corpo uterino – IA pós-cervical [38,42] ou no interior do corno uterino – IA intra-uterina profunda [20, 21,33]. Essas técnicas permitem uma considerável redução no número de espermatozoides aplicados, entretanto apresentam algumas limitações que ainda impedem seu uso comercial em larga escala. Para maiores detalhes nesse assunto é possível consultar Vazquez et al. [34,35], Martinez et al. [19] e Bortolozzo et al. [6]. No entanto, o objetivo da presente revisão é abordar qual o número mínimo de espermatozoides que podem ser empregados em doses utilizadas na IA tradicional (com deposição intra-cervical) e quais os fatores que influenciam no desempenho reprodutivo advindos de variações na quantidade de espermatozoides empregados nessa técnica de IA.

I - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO ESPERMÁTICA

A concentração espermática é fundamental para a determinação do número total de espermatozoides do ejaculado, permitindo desta forma, o cálculo do número de doses que podem ser obtidas do mesmo. Na espécie suína, este parâmetro pode ser avaliado através da contagem direta em câmara hemocitométrica, pelo espermodensímetro de Karras, fotolorimetria ou contagem eletrônica de partículas [9].

A contagem em câmara hemocitométrica é considerado o método mais preciso, estando diretamente relacionado com o alto número de células contadas, a diluição do sêmen e a distribuição homogênea na câmara de

contagem [9]. Entretanto, é muito trabalhoso, requer mão-de-obra qualificada e habilidosa, sendo indicado para centrais de IAs (CIAs) pequenas. Quando a mão-de-obra destas centrais é limitada, pode-se utilizar o espermodensímetro de Karras. Este método baseia-se na turbidez de uma amostra de sêmen diluído, colocada no interior do aparelho, no qual procede-se a leitura da escala presente no recipiente. Por ser um método empírico, pode ocorrer um aumento na margem de erro, principalmente, se os devidos cuidados com a diluição não forem tomados [40,41].

A fotolorimetria é uma técnica indireta de determinação de células da amostra através do grau de absorvância de luz pelo ejaculado. Os aparelhos atuais são comercializados com uma calibração específica para o sêmen suíno, sendo um método prático e simples para ser utilizado em centrais de coleta maiores. As falhas observadas com seu uso estão, geralmente, relacionadas a variações individuais dos doadores, como opalescência ou aglutinações no ejaculado, ou devido à carência de manutenção do equipamento [4].

A contagem eletrônica de partículas, através do coulter counter, permite uma rápida determinação da concentração, porém esta foi subestimada ao ser comparada com a contagem na câmara hemocitométrica. Um dos prováveis motivos podem ser as aglutinações, que formam partículas maiores não sendo identificadas como espermatozoides pelo aparelho. Este método permite a avaliação rápida e precisa de um grande número de amostras, porém necessita de aferição dos resultados, cuidados especiais de manutenção e limpeza constantes, além de possuir custo elevado.

Mais recentemente, CIAs de grande porte tem empregado métodos de análise computadorizada nos ejaculados. Essas metodologias permitem, dentre outros, a determinação da concentração do ejaculado baseado na contagem direta dos espermatozoides durante a realização da análise de motilidade, uma vez que um volume conhecido de sêmen é analisado.

O método a ser empregado deve ser escolhido conforme a viabilidade técnica e econômica de cada central. Entretanto, nunca deve ser esquecida a importância de calibrar e aferir periodicamente os aparelhos, bem como conferir se as doses produzidas possuem o número correto de espermatozoides, visando sempre o controle de qualidade [9].

II - FATORES QUE PODEM INFLUENCIAR NA DEFINIÇÃO DO NÚMERO DE ESPERMATOZÓIDES A SEREM EMPREGADOS POR DOSE

No passado, inúmeros trabalhos foram realizados avaliando variações simples no número de espermatozoides colocados em cada dose, entre os quais pode-se citar Baker et al. [2], Colenbrander et al. [11], Mercat et al. [22], Park et al. [25] e Marchetti et al. [18]. É claro que com a evolução técnica, com o aprimoramento na rotina e com a melhora na qualidade dos insumos empregados na IA; foram observadas diferenças no número de espermatozoides empregados ao longo das últimas 2-3 décadas. De forma geral conclui-se que, ao empregar a IA intra-cervical, resultados satisfatórios são obtidos com doses contendo entre 2,5 e 4 bilhões de espermatozoides. Entretanto, mesmo nas inseminações realizadas corretamente, levando em consideração a técnica empregada e o momento da realização, inúmeros fatores influenciarão na definição de um número mínimo de espermatozoides em cada dose. Alguns destes estão ao nosso alcance e podem ser controlados, outros, entretanto, são ainda objetos de estudo. São eles:

1 – Doador de sêmen

A IA é uma realidade junto à suinocultura tecnificada mundial e a necessidade de machos doadores de sêmen em quantidade e qualidade adequadas é imprescindível, uma vez que cada animal é responsável pela prenhez de um grande número de fêmeas do plantel.

A avaliação clínica dos reprodutores e o exame do ejaculado permite eliminar doadores que apresentem infertilidade, porém nem sempre é possível identificar os sub-férteis da população. Alguns pesquisadores [15,27] não encontraram relação confiável entre as avaliações de motilidade durante o armazenamento e morfologia do sêmen, com os dados de fertilidade *in vivo*. Porém, a redução do número de espermatozoides por dose pode evidenciar tanto machos com baixa fertilidade, como aqueles com fertilidade superior, que passariam despercebidos empregando doses com o número tradicional de espermatozoides. Como pode ser observado na Figura 1, alguns machos atingem a taxa de fertilidade alvo com 2 bilhões de espermatozoides (ou menos) enquanto outros necessitam de 3 bilhões, sendo que um número maior de espermatozoides por dose não reflete um aumento da fertilidade.

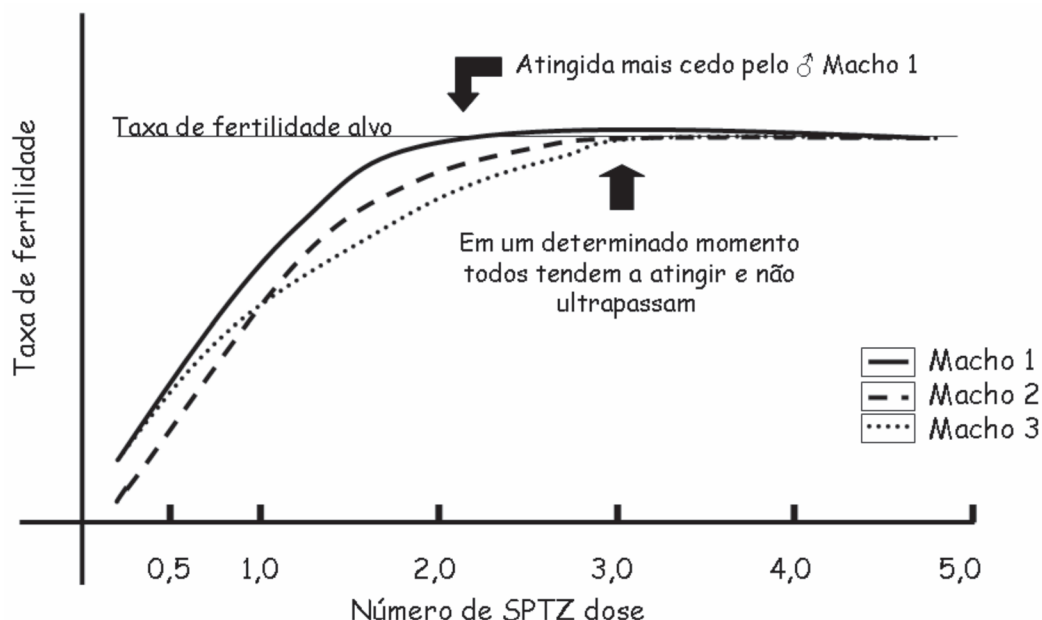


Figura 1. Taxa de fertilidade alvo em função do número de espermatozoides por dose de acordo com o reprodutor

Mezalira et al. [23] realizaram um estudo no qual foram utilizados os ejaculados de 4 machos para inseminar, intra-uterinamente, 211 fêmeas. Os 4 reprodutores estavam alojados em uma central de IA e suas doses eram aprovadas e empregadas na rotina de um programa de IA. Ao empregar no experimento, as doses foram avaliadas quali- e quantitativamente e também foram submetidas a uma avaliação da motilidade por um período de 10 dias, onde foram observadas diferenças entre os reprodutores. As doses inseminantes apresentavam $0,25$, $0,5$ e $1,0 \times 10^9$ espermatozoides, sendo que apenas uma inseminação foi realizada por fêmea no período de 0 – 24 horas antes da ovulação. Os autores não encontraram diferenças na taxa de prenhez entre os tratamentos. Entretanto, quando esta taxa foi avaliada entre os machos, pôde-se observar claramente uma diferença de fertilidade entre eles. Enquanto no macho D observou-se uma taxa de prenhez de 20, 55,6 e 60%, respectivamente, para doses com $0,25$, $0,5$ e $1,0 \times 10^9$ espermatozoides, o macho C demonstrou taxas de prenhez superiores a 95% nas diferentes doses (Figura 2). Devido ao número de matrizes empregadas, não foi possível avaliar adequadamente o efeito dos reprodutores e do número de espermatozoides empregados na dose sobre o número de embriões viáveis, estimando assim o tamanho da leitegada.

No entanto, sabe-se que o tamanho da leitegada pode variar entre cachaaços quando o mesmo número de espermatozoides é empregado na dose [14]. Além disso, para alguns cachaaços, o aumento no número de espermatozoides na dose resulta em um aumento no tamanho da leitegada. Entretanto, a magnitude da resposta no tamanho da leitegada frente a um aumento no número de espermatozoides na dose não é a mesma para todos os machos [14].

Xu et al. [43] trabalhando com fertilização *in vitro*, avaliaram 6 doadores, com fertilidade comprovada, e observaram que apenas um, quando comparado com os demais, demonstrou baixos valores para taxa de penetração, taxa de polispermia, número médio de espermatozoides por oócito penetrado e aderido e alta taxa de monospermia, indicando que a fertilização *in vitro* é capaz de demonstrar machos sub-férteis em um estágio mais precoce que as avaliações de rotina.

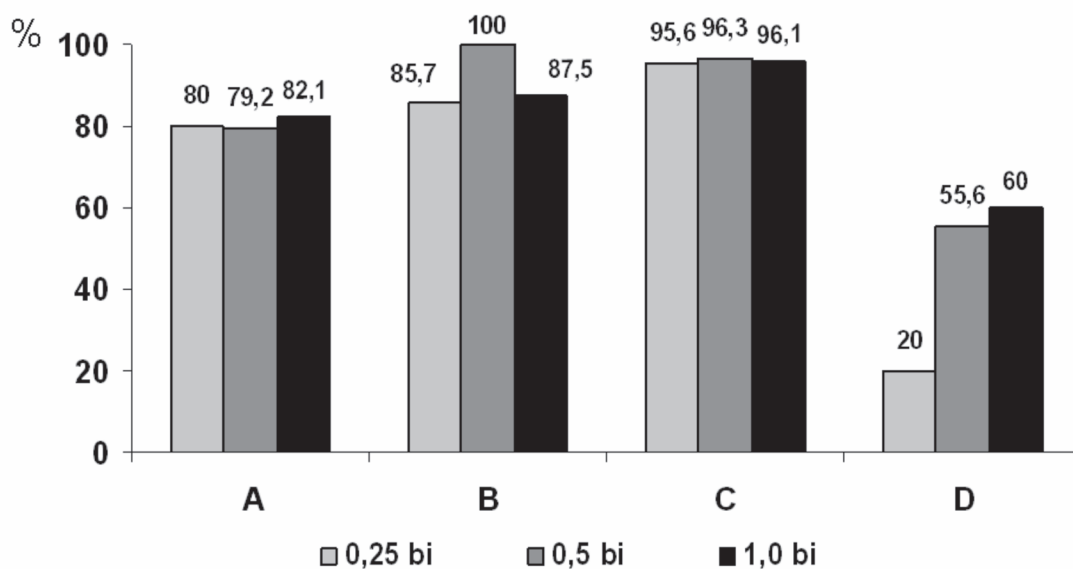


Figura 2. Taxa de prenhez após a IA uterina com 0,25 0,5 e 1,0 bilhão de espermatozoides por dose de acordo com o macho

Fonte: Mezalira et al. [23]

2 - Intervalo entre a IA e a ovulação

O intervalo entre a IA e a ovulação (IAOV) influencia a taxa de fecundação em suínos, pois acredita-se que os espermatozoides permaneçam viáveis para fecundar a população de oócitos por um período máximo de 24 horas antes da ovulação e os oócitos, por sua vez, devem ser fecundados logo após a ovulação por espermatozoides capacitados. Trabalhos realizados para verificar qual seria o melhor intervalo entre IA e a ovulação concluíram que este período difere entre porcas e leitoas. Além disso, pode ser especulado que alguns doadores atingem melhores resultados de acordo com o intervalo IAOV.

Trabalhando com múltiparas, Soede et al. [31] avaliaram o efeito da IA realizada em diferentes intervalos, antes e após a ovulação (48 horas antes até 16 horas após), sobre a taxa de fecundação, o desenvolvimento embrionário precoce e o número de espermatozoides acessórios. Os resultados encontrados mostraram que quando a IA foi realizada no período de 0 – 24 horas antes da ovulação, o percentual de embriões normais foi significativamente maior do que nas IAs realizadas antes e depois deste intervalo. Além disto, um baixo número de espermatozoides acessórios foi encontrado na zona pelúcia quando o intervalo entre a IA e a ovulação foi maior que 24 horas. Isto pode estar relacionado ao envelhecimento e morte dos espermatozoides em função de radicais livres e substâncias oxidativas, existentes no trato genital feminino, que lesam seu núcleo e aumentam a incidência de morte embrionária. Nissen et al. [24] avaliaram o desempenho reprodutivo de porcas inseminadas entre 36 horas antes e 9 horas após a ovulação. Os resultados encontrados, ao observar a taxa de parto e tamanho de leitegada, demonstraram que o intervalo ideal para realizar a IA foi de 28 horas antes até 4 horas após a ovulação.

Avaliando leitoas, Waberski et al. [36] estudaram a taxa de fecundação em diferentes intervalos IAOV, utilizando doses com 2 bilhões de espermatozoides. Os autores concluíram que o intervalo ideal para inseminar esta categoria situa-se entre 0-12 horas antes da ovulação. Entretanto, o período avaliado foi somente de 0-16 horas antes da ovulação, sendo o grupo de 12-16 horas pouco representativo (apenas 5 animais). Bortolozzo et al. [8] avaliaram 102 leitoas, utilizando doses com 4 bilhões de espermatozoides, e observaram que as inseminações realizadas com um intervalo entre 16 e 24 horas anteriores à ovulação, apresentaram taxa de prenhez de 88,9%, já naquelas com intervalo de 0 a 16 horas, a taxa foi de 100% ($P=0,08$). O número de embriões também diminui à medida que o intervalo entre inseminação e ovulação aumenta, o que pode ser devido a um número insuficiente de espermatozoides no oviduto no momento da ovulação. Os autores concluíram que as leitoas apresentam uma taxa de prenhez reduzida quando o intervalo é superior a 16 horas. Esta diferença de intervalo ideal IAOV encontrada entre os dois trabalhos pode ter ocorrido, tanto em função do número de espermatozoides utilizados nas doses, como pelo reduzido número de animais avaliados no grupo de 12-16 horas no primeiro estudo.

Bennemann et al. [3] observaram 218 leitões com o objetivo de avaliar 3 diferentes intervalos IAOV (0-12h, 13-23h, 24-30h). Estes animais receberam apenas uma inseminação com uma dose de 1,5 bilhões de espermatozoides, armazenada entre 0 – 48 horas ou 96 – 120 horas. Nas IAs realizadas até 23 horas antes da ovulação, empregando as doses armazenadas até 48 horas, as taxas de prenhez foram superiores a 90% e um número maior do que 14 embriões foi encontrado. Entretanto, quando o intervalo IAOV aumentou para 24 – 30h, a taxa de prenhez diminuiu para 85,7% e o número de embriões para 13,2 (Tabela 1). Provavelmente pelo reduzido número de animais essa diferença não foi assegurada estatisticamente.

Tabela 1. Taxa de prenhez (PR), número de corpos lúteos (CL), número total de embriões (TE) e sobrevivência embrionária (SE) de leitões inseminados em diferentes intervalos inseminação – ovulação (IAOV) com doses armazenadas por diferentes períodos.

Tempo de armazenamento (h)	IAOV (h)	PR (%) (n/n)	n	CL*	TE*	SE (%)*
0-48	0-12	93.4 (57/61) ^a	55	17.6 ± 2.6	14.1 ± 3.2 ^a	78.6 17.5 ^a
	13-23	91.9 (34/37) ^a	33	18.0 ± 3.4	14.2 ± 4.8 ^a	75.1 20.9 ^a
	24-30	85.7 (18/21) ^a	18	17.1 2.5	13.2 3.9 ^a	71.9 21.0 ^a
96-120	0-12	78.3 (47/60) ^b	43	17.5 ± 2.6	13.2 ± 4.4 ^a	73.3 23.7 ^a
	13-23	73.1 (19/26) ^b	13	16.1 ± 1.7	14.3 ± 4.7 ^a	76.1 26.0 ^a
	24-30	30.8 (4/13) ^c	4	15.7 ± 2.5	6.5 ± 2.1 ^b	31.9 13.2 ^b

*LSMEANS ± DESVIO PADRÃO; a,b,c nas colunas P<0,05
Fonte: [3]

3 - Qualidade da dose de sêmen empregada

A qualidade da dose inseminante (DI) está relacionada a fatores individuais dos machos e inerentes a tecnologia do sêmen, como coleta, manipulação e armazenamento do ejaculado. Uma forma simples, rápida e eficaz de se avaliar o ejaculado consiste no exame de motilidade. Este parâmetro está intimamente relacionado à viabilidade, ou seja, a percentagem de células móveis é altamente correlacionada com a quantidade de espermatozoides vivos ou viáveis, apesar de nem sempre representar uma correlação significativa com a fertilidade.

Bortolozzo et al. [5] avaliaram 5 centrais de IA com o objetivo de verificar a qualidade das doses inseminantes. Para tal foram coletadas amostras de sêmen, nas quais foram realizadas diferentes avaliações, estando entre elas o exame de motilidade. Este foi realizado durante o armazenamento por um período de 96 horas. O autor concluiu que existe diferença na qualidade das doses entre as diferentes centrais. Nas centrais A, B, e E houve uma tendência à queda linear em relação ao tempo. A central C apresentou uma queda brusca da motilidade já nas primeiras 24 horas, estabilizando após este período e a central D, manteve um comportamento linear até as 48 horas, quando apresentou uma queda brusca que persistiu até as 96 horas. Portanto, a CIA poderá ser a responsável por uma queda na performance reprodutiva do rebanho, caso um menor número de espermatozoides por dose passe a ser utilizado. Sendo que assim como um aumento do número de espermatozoides não é capaz de melhorar as taxas reprodutivas, também não será capaz de compensar uma dose de baixa qualidade.

Além disso, existe a correlação da qualidade com aspectos inerentes ao macho, cuja viabilidade espermática *in vitro* apresenta um período maior ou menor conforme o doador. Reis [28] avaliou se a motilidade durante o armazenamento (17°C) apresentava o mesmo padrão de comportamento que a morfologia de acrossoma e integridade das membranas, com o objetivo de correlacionar com a fertilidade. Para tal, cinco ejaculados de 31 machos foram analisados e classificados em 3 grupos (longa, média e curta) conforme duração da viabilidade *in vitro*. A autora concluiu que apenas a motilidade e a integridade de membrana permitem a diferenciação entre os machos de maior e menor duração da viabilidade a 17°C. Observou ainda que a duração da viabilidade espermática se repete nas coletas subsequentes, uma vez que os machos de longa duração, não apresentaram ejaculados de curta duração e os machos classificados como de curta nunca foram classificados como de longa. Entretanto, as amostras de média duração apresentaram tanto ejaculados de longa como de curta duração. Uma maior viabilidade *in vitro* poderia apresentar uma correlação com a fertilidade *in vivo* e, portanto, essas avaliações poderiam ser utilizadas

para uma diferenciação de machos com maior fertilidade, os quais poderiam ter uma redução no número de espermatozoides por dose. Vários estudos têm sido realizados na tentativa de comprovar essa hipótese e seus resultados vêm demonstrando que a motilidade ainda parece ser a melhor forma de avaliar a fertilidade do macho.

Xu et al. [44] realizaram 5 diluições seriadas no sêmen de 3 doadores (A, B e C) e avaliaram suas taxas de fertilização *in vitro* e a motilidade nos dias 0 e 7 pós-coleta. A taxa de penetração foi baixa em todas as diluições do doador C ($p < 0,05$) quando comparado com os outros machos e foi altamente correlacionada com a motilidade espermática no 7º dia pós-coleta. Ruiz-Sánchez et al. [30] realizaram um estudo comparativo entre a motilidade nos dias 0, 3, 7 e 10 e a fertilidade dos machos. Uma forte correlação positiva também foi encontrada entre a motilidade, dos dias 7 e 10, e a taxa de penetração ($r = 0,84$, $P = 0,009$; $r = 0,88$, $P = 0,01$, respectivamente).

Seguindo essa linha de raciocínio, Xu et al. [43] compararam técnicas de fertilização e maturação *in vitro* com a fertilidade *in vivo*, dos mesmos machos. A avaliação *in vitro* constou de análises morfológicas e de motilidade. A fertilização *in vitro* foi avaliada a partir da taxa de penetração, polispermia, taxa de formação do pró-núcleo masculino, número de espermatozoides por oócitos e taxa de potenciais embriões. Para a avaliação *in vivo*, foram utilizadas doses inseminantes com 2 e 3 x 10⁹ espermatozoides, para uma melhor comparação e para demonstrar o potencial de otimização do uso de sêmen de machos com alta fertilidade. Esta redução no número de espermatozoides não diminuiu a taxa de parto, porém ocorreu redução no tamanho da leitegada, indicando que essa é mais sensível a mudanças na população espermática. Os autores concluíram que a morfologia apresenta uma correlação positiva com o tamanho de leitegada e que as doses contendo 3 x 10⁹ espermatozoides podem mascarar a fertilidade do macho. Através da técnica de fertilização *in vitro*, estes autores concluíram que a formação do pró-núcleo masculino é capaz de diferenciar os machos quanto à fertilidade, sendo que aqueles que apresentam formação reduzida são menos férteis.

Outra avaliação qualitativa do ejaculado é o exame morfológico. Um percentual elevado de células anormais pode ser indicativo de alterações na espermatogênese, na maturação espermática ou devido à manipulação imprópria do ejaculado. Através deste exame é possível descartar reprodutores com ejaculados de baixa qualidade para emprego na IA. Entretanto, quando os parâmetros morfológicos estão dentro dos limites aceitáveis, o resultado do exame de morfologia espermática não permite estabelecer o real nível de fertilidade do ejaculado. Os ejaculados são considerados aceitáveis quando os defeitos de cabeça não ultrapassam 10% e quando nenhum dos outros defeitos ultrapassarem 5%, individualmente, e 10 – 15% no total [29]. Segundo o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal [10], as alterações totais não devem ultrapassar 20%. Feitsma et al. [13] analisaram 512.000 ejaculados, provenientes de 2 CIAs, e compararam com dados de fertilidade de mais de 3 milhões de IAs, com o objetivo de verificar o que ocorria com a fertilidade em diferentes graus de alterações na morfologia espermática. Os pesquisadores encontraram uma média de 5,5% de defeitos primários e 10,1% de defeitos secundários, totalizando 15,5% de células alteradas por ejaculado e concluíram que os defeitos são altamente correlacionados. Portanto, um ejaculado com alto percentual de um determinado defeito é preditivo para a presença de outras anormalidades. Além disto, encontraram uma correlação negativa entre o percentual de células anormais e a fertilidade, ou seja, quanto maior o número de células anormais, menor a fertilidade. Se ocorrer um aumento de 10% nas alterações espermáticas (de 20 para 30%) o número de nascidos totais reduz em 0,08 leitão e a taxa de parto em 0,5%. Se este sêmen, que deveria ter sido descartado, for utilizado, ele produzirá um impacto econômico de 1,5 leitões a menos, uma vez que com cada ejaculado é possível inseminar de 15 a 20 matrizes.

4 - Tempo de armazenamento *in vitro* da dose de sêmen e suas interações com o intervalo entre a IA e a ovulação

Quando o sêmen é coletado e armazenado para ser utilizado posteriormente, inicia um processo de envelhecimento dos gametas, como se fosse um “timer” em contagem regressiva. As células passam para um ambiente controlado artificialmente e vários fatores influenciam em sua sobrevivência futura. Segundo Leeuw et al. [17], o espermatozóide suíno é, particularmente, sensível ao resfriamento e quando exposto a temperaturas inferiores a 15°C, sua taxa de sobrevivência diminui. Este fenômeno é atribuído a alterações estruturais e bioquímicas que levam a ruptura da membrana plasmática, degeneração do acrossoma, perda da permeabilidade seletiva da membrana, levando a perda de íons e a liberação de enzimas.

A célula espermática possui uma alta taxa metabólica e necessita de um constante fornecimento de energia. Quando o ejaculado é armazenado ocorre degradação da glicose e conseqüente produção de CO₂, H₂O e produtos ácidos, como o ácido lático, alterando o pH do meio e o período de viabilidade espermática. Para diminuir estas e outras alterações do meio e, conseqüentemente, das células, os diluentes são compostos de tampões, estabilizadores de membrana, quelantes de íons metálicos bivalentes (EDTA), antimicrobianos entre outros, na tentativa de prolongar ao máximo a viabilidade do espermatozóide. Entretanto, todo este sistema metabólico criado

artificialmente apresenta um curto período de funcionamento, ou seja, à medida que os componentes vão sendo utilizados, produtos de degradação vão se formando, o meio vai sendo modificado, as células vão envelhecendo e perdendo a viabilidade [9].

Weitze [39] avaliou se o tempo de armazenamento da dose era capaz de diminuir o desempenho reprodutivo de fêmeas suínas. O experimento foi realizado utilizando doses armazenadas por 3 ou 5 dias, sendo estas conservadas com 2 diluentes diferentes, Kiev e BTS. Ao comparar as taxas de parto entre os diferentes períodos de armazenamento do sêmen, o autor encontrou uma redução significativa de 11,8%, para o diluente de Kiev, e 11,9%, referente ao BTS. Entretanto, o tamanho da leitegada apenas diferiu significativamente no grupo do BTS, onde ocorreu uma redução de 0,7 leitão. No entanto, é necessário levar em consideração o intervalo IAOV para afirmar que doses armazenadas por mais de 3 dias, quando utilizadas num período próximo a ovulação, não produzem resultados satisfatórios.

No momento em que os espermatozoides são depositados no trato genital feminino, eles são rapidamente direcionados, através de contrações uterinas, ao reservatório espermático, onde irão sofrer a capacitação. Acredita-se que neste local as células permaneçam viáveis para fecundar, por um período de até 24 horas. Portanto, para se obter um bom desempenho reprodutivo, é importante que as IAs sejam realizadas num período próximo da ovulação [9].

Com o objetivo de avaliar o efeito do envelhecimento *in vitro* e *in vivo* dos espermatozoides, Waberski et al. [37] utilizaram doses inseminantes, contendo 2 bilhões de espermatozoides, com diferentes períodos de armazenamento e compararam com diferentes intervalos IAOV. As DIs foram classificadas em 3 grupos conforme o período de armazenamento: A (0 – 48 horas), B (48 – 87 horas) e C (87 – 120 horas). Os intervalos IAOV foram classificados em 0 – 12h, 12 – 24h e maior que 24 horas anteriores à ovulação. Ao utilizarem o grupo A, não foram observadas diferenças nas taxas de fecundação independente do intervalo IAOV, embora no intervalo IAOV > 24 h tenham sido observados somente 3 animais. Quando as leitoas foram inseminadas com o grupo B, as taxas de fecundação caíram de 89,4% para 54,1% e 45,9%, respectivamente, para os intervalos de 0 – 12h, 12 – 24h e maior que 24 horas. As fêmeas que receberam as doses do grupo C apresentaram taxas de fecundação inferiores, independente do intervalo IAOV. Conclui-se que não há diferença nas taxas de fecundação quando se utilizam doses armazenadas por 48 horas em intervalos de IAOV < 24 horas.

Seguindo a mesma linha de pesquisa, Bennemann et al. [3] avaliaram 2 tempos de armazenamento das DIs (0 – 48 e 96 – 120 horas) e relacionaram com o momento do intervalo IAOV (0-12h, 13-23h, 24-30h) de leitoas (Tabela 1). Apenas uma inseminação com 1,5 bilhões de espermatozoides foi realizada. Não foram observadas diferenças significativas na taxa de prenhez das fêmeas que receberam as doses armazenadas até 48 horas. Entretanto, ocorreu redução significativa nas matrizes cujas doses foram armazenadas por um período de tempo superior, sendo de 30,8% naquelas inseminadas no intervalo de 24 – 30 horas da ovulação. Em relação ao número total de embriões, ocorreu redução significativa (6,5 embriões) apenas nas fêmeas inseminadas com as doses que tiveram um maior tempo de armazenamento, associado ao maior intervalo IAOV.

5 - Aumentar o número de espermatozoides na dose tem algum efeito compensatório

Para avaliarmos as conseqüências de um aumento no número total de espermatozoides das doses é necessário ter em mente possíveis modificações na taxa de diluição do ejaculado, na redução do lucro das centrais e, principalmente, se esse aumento traria algum benefício em termos reprodutivos. A taxa de diluição do ejaculado foi avaliada por Alexopoulos et al. [1] que observaram um decréscimo significativo na motilidade espermática ao comparar doses com maior (5×10^9 spz/DI) e menor número de espermatozoides (1×10^9 e 3×10^9 spz/DI), devido ao pobre ambiente metabólico gerado nas doses com menores taxas de diluição.

Financeiramente, a perda das centrais é evidente, no momento em que se aumenta o número de espermatozoides por dose, um menor número de doses poderá ser produzido com um mesmo ejaculado, diminuindo seu lucro.

Pensando na parte reprodutiva, Flowers [14] relatou que um aumento do número de espermatozoides na dose inseminante resulta, inicialmente, em um aumento da fertilidade, entretanto, a magnitude desta resposta diminui gradualmente à medida que o número de espermatozoides aumenta até alcançar um platô. A partir deste ponto um número adicional de espermatozoides não afeta a fertilidade. Essa avaliação fica evidente quando se observa a Figura 1.

Apesar de Flowers [14] relatar que o aumento no número de espermatozoides por si só atinge esse platô descrito, o autor especula que talvez seja possível compensar uma diminuição da qualidade de sêmen através de um aumento no número de espermatozoides por doses armazenadas em diferentes períodos. Esta afirmação está baseada em um estudo realizado por Johnson et al. [1988 apud 14] onde doses empregadas com até 72 horas de armazenamento continham 3×10^9 enquanto aquelas com um período de armazenamento superior a 72 horas

continham 6×10^9 . Não foram observadas diferenças no tamanho da leitegada em função do período de armazenamento da dose, ou seja, ao que parece dobrar o número de espermatozoides trouxe um efeito compensatório ao aumento do período de armazenamento das doses. Entretanto, esses dados devem ser observados com cautela, pois não foi empregado um grupo contemporâneo inseminando com 3×10^9 com período de armazenamento superior a 72 horas.

Seguindo o mesmo raciocínio, Pedersen [26] avaliou doses com 3 diferentes números de espermatozoides sendo a primeira IA realizada quando as doses apresentavam 48 horas de armazenamento e a segunda 24 horas mais tarde. As doses apresentavam 1,4, 2,8 e 5,6 bilhões de células espermáticas. Tanto a taxa de parto como o tamanho da leitegada, foram significativamente menores no grupo inseminado com 1,4 bilhões. Entretanto, não foi demonstrada diferença significativa entre os demais grupos. Os autores concluíram que um aumento no número de espermatozoides não foi compensado por uma melhora na performance reprodutiva.

Da mesma forma, Steverink et al. [32] avaliaram se um aumento no número de espermatozoides por dose melhoraria o desempenho reprodutivo de multíparas. Para tal utilizaram 2 intervalos IAOV e doses com diferentes números de espermatozoides. No intervalo (12 – 24h) foram utilizadas doses de 1 e 3 bilhões, e no intervalo sub-optimal (24 – 36 horas) doses com 3 e 6 bilhões de espermatozoides. Não foi observada diferença significativa no percentual de embriões viáveis entre os tratamentos (Tabela 2). Ou seja, se a IA é realizada em um intervalo ótimo (no caso 12-24hs antes da ovulação), bons resultados são atingidos até mesmo com 1 bilhão de espermatozoides. Entretanto, se o intervalo IAOV é sub-optimal, não adianta suplementar o número de espermatozoides na dose (no caso empregando doses de 6 bilhões 24-36 h antes da ovulação).

Tabela 1. Influência do intervalo IAOV e o número de espermatozoides por dose sobre a fertilidade de porcas.

	IA 12-24h antes da ovulação		IA 24-36h antes da ovulação	
N° SPTZ / dose	1 x 10 ⁹	3 x 10 ⁹	3 x 10 ⁹	6 x 10 ⁹
Porcas (n)	16	17	16	20
Intervalo IAOV (h)	19±3	20±3	29±4	30±3
Embriões viáveis (%)	89±15	88±28	83±22	83±26
SPTZs Acessórios	30±41	22±20	16±18	11±9

P>0,05 dentro do mesmo intervalo IAOV
Fonte: Steverink et al. [32]

6 - Experiências forçadas com a redução do número de espermatozoides por dose

No final da década de 90, problemas sanitários levaram ao fechamento de algumas centrais de sêmen na Holanda. Para atender a demanda de doses, optou-se pela redução de 3 bilhões para 2 bilhões de espermatozoides por dose. Os resultados obtidos com 2 bilhões foram bastante satisfatórios. Seguindo essa linha de redução, Feitsma e Bergsma [12] avaliaram uma redução mais drástica no número de espermatozoides das doses sobre a performance reprodutiva. Para sua realização foram utilizados 2 grupos de animais, um controle, no qual a dose apresentava de 2,2 a 2,5 bilhões de espermatozoides, e um tratamento com doses de 1 bilhão de espermatozoides. A taxa de partos foi de 88,1% e 86,0% e o número de nascidos totais foi de 13,9 e 13,4, respectivamente para as fêmeas inseminadas com 2,2-2,5 e 1 bilhão de espermatozoides. Não foram encontradas diferenças significativas na taxa de parto e número de leitões nascidos totais entre os grupos. Entretanto, como o número total de fêmeas avaliadas foi de 577 e 565, respectivamente, para os grupos controle e tratamento e, segundo os autores, cada grupo deveria ter no mínimo 2000 – 2500 fêmeas, esses resultados devem ser avaliados com cautela e novos estudos devem ser realizados para uma melhor avaliação da redução do número de espermatozoides por dose.

CONCLUSÕES

A inseminação artificial intra-cervical é um método consolidado na rotina das granjas e que gera, quando bem empregado, uma ótima performance reprodutiva. A possibilidade de reduzir o número de espermatozoides por dose produziria um forte impacto econômico e, portanto, deve ser vista com bons olhos. Porém, para a manutenção

do desempenho reprodutivo, é necessário que certos cuidados sejam tomados. A manipulação do ejaculado nas centrais, desde a coleta até o armazenamento, deve obedecer a padrões rigorosos de higiene e avaliação, bem como a taxa de diluição das doses. Os ejaculados devem ser avaliados com vistas a diferenciar machos sub-férteis, visando um possível descarte dos mesmos. E, além disto, as doses devem ser armazenadas adequadamente, tanto na CIA como no transporte e no destino. Como foi visto, a redução do número de espermatozoides é perfeitamente viável, desde que se tomem algumas precauções. Por outro lado, o aumento no número de espermatozoides por dose, buscando um efeito compensatório, não é recomendado uma vez que não melhora a performance reprodutiva e diminui os rendimentos das centrais.

REFERÊNCIAS

- 1 **Alexopoulos C., Boscos C., Saratsis P.H., Saloulidis C. & Kyriakis S. 1996.** The effect of storage time and number of spermatozoa per insemination dose on semen characteristics and fertility capacity of boar semen diluted in Beltsville Thaw solution (BTS) extender. *Animal Science*. 62: 599-604.
- 2 **Baker R.D., Dziuk P.J. & Norton H.W. 1968.** Effect of volume of semen, number of sperm and drugs on transport of sperm in artificially inseminated gilts. *Journal of animal Science*. 27: 88-93.
- 3 **Bennemann P.E., Diehl G.N., Milbradt E., Vidor R.M., Fries H.C.C., Wentz I., Bernardi M.L. & Bortolozzo F.P. 2005.** Artificial Insemination of gilts with 1,5 billion sperms stored in different periods associated with different pre-ovulatory intervals. *Reproduction Domestic Animal*. 40: 507-510.
- 4 **Borchardt Neto G., Guidoni A.L., Bortolozzo F.P., Ferreira F.M. & Wentz Ivo. 1995.** Modelo logístico para estimar a concentração espermática pela fotolorimetria. In: *Anais do 7º Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos* (Blumenau, Brasil).p.137.
- 5 **Bortolozzo F.P., Bennemann P.E., Wentz I. & Cardoso M.R.I. 2000.** Avaliação de doses inseminantes produzidas em centrais de inseminação artificial de suínos no sul do Brasil. II Qualidade espermática. *Arquivo da Faculdade de Veterinária da UFRGS*. 28:63-75.
- 6 **Bortolozzo F.P., Bernardi M.L. & Wentz I. 2005.** Perspectivas do emprego da inseminação artificial intra-uterina em suínos. In: *Curso pré-congresso do 12º Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos* (Fortaleza, Brasil). p.32.
- 7 **Bortolozzo F.P., Dallanora D., Bernardi M.L., Bennemann P.E. & Wentz I. 2003.** Técnicas associadas à inseminação artificial no suíno que visam a redução do número de espermatozoides necessários por fêmea ao ano. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 27:133-139.
- 8 **Bortolozzo F.P., Uemoto D.A, Bennemann P.E., Pozzobon M.C., Castagna C.D., Peixoto C.H., Barioni Jr.W. & Wentz I. 2005.** Influence of time of insemination relative to ovulation and frequency of insemination on gilt fertility. *Theriogenology*. 64: 1956-1962.
- 9 **Bortolozzo F.P., Wentz I., Ferreira F.M., Bennemann P.E. & Bernardi M.L. 2005.** Exame do ejaculado. In: Bortolozzo F.P. & Wentz I. (Eds) *Suinocultura em ação: Inseminação artificial na suinocultura tecnificada*. Porto Alegre: Pallotti. 2: 69-90.
- 10 **Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1998.** *Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal*. 2.ed. Belo Horizonte:CBRA 49p.
- 11 **Colenbrander B., Feitsma H. & Grooten H.J. 1993.** Optimizing semen production for artificial insemination in swine. *Journal of Reproduction and fertility*. (Suppl). 48: 207-215.
- 12 **Feitsma H. & Bergsma R. 2006.** Field trial results of low dose inseminations in pigs. In: *Proceedings of the 19th International Pig Veterinary Society Congress* (Copenhagen, Denmark). p. 544.
- 13 **Feitsma H., Bergsma R. & Ducro-Steeverink D.W. 2006.**The effect of morphological abnormal cells on sow fertility. In: *Proceedings of the 19th International Pig Veterinary Society Congress* (Copenhagen, Denmark). p. 545.
- 14 **Flowers W.L. 2002.** Increasing fertilization rate of boars: Influence of number and quality of spermatozoa inseminated. *Journal Animal Science*. 80 (E. Suppl.1): E47-E53.
- 15 **Foxcroft G.R. 2002.** Melhorando os resultados na inseminação artificial e monta natural. In: *Minicurso de reprodução do 1º Congresso Latino Americano de Suinocultura* (Foz do Iguaçu, Brasil). pp.25-37.
- 16 **Krueger C. & Rath D. 2000.** Intrauterine insemination in sows with reduced sperm number. *Reprod Fertil Dev*. 12:113-117.
- 17 **Leeuw F.E., Colenbrander B. & Verkelij A.J. 1991.** The role membrane damage plays in cold shock and freezing injury. In: *Supplement 1 of the 2nd International Conference On Boar Semen Preservation* (Beltsville, U.S.A.). pp.95-104.
- 18 **Marchetti A.N., Bortolozzo F.P., Wentz I. & Borchardt Neto G. 2001.** Efeito da utilização de 2, 3 e 4 bilhões de espermatozoides na dose inseminante sobre a taxa de retorno ao estro, taxa de parto e tamanho das leitegadas de fêmeas suínas. *ARS. Veterinária*. 17: 07-112.
- 19 **Martinez E.A., Vazquez J.M., Roca J., Cuello C., Gil M.A., Parrilla I. & Vazquez J.L. 2005.** An update on reproductive technologies with potential short-term application in pig production. *Reproduction Domestic Animal*. 40: 00-309.
- 20 **Martinez E.A., Vazquez J.M., Roca J., Lucas X., Gil M.A., Parrilla I. & Vazquez J.L. 2001.** Successful non-cirurgical deep intrauterine insemination with low number of spermatozoa in sows by a fiberoptic endoscope technique. *Reproduction*.112: 289-296.
- 21 **Martinez E.A., Vazquez J.M., Roca J., Lucas X., Gil M.A., Parrilla J.L., Vazquez J.L. & Day B.N. 2002.** Minimum number of spermatozoa required for normal fertility after intrauterine insemination in non-sedated sows. *Reproduction*. 123: 163-170.

- 22 Mercat M.J., Floch M., Pellois H. & Runavot J.P. 1999. Reduction on sperm cell number per insemination dose. In: *Abstracts of the 4th international conference on boar semen preservation*. (Beltsville, U.S.A.) p.33.
- 23 Mezalira A., Dallanora D., Bernardi M.L., Wentz I. & Bortolozzo F.P. 2005. Influence of sperm cell dose and post-insemination backflow on reproductive performance of intrauterine inseminated sows. *Reproduction in Domestic Animals*. 40: 1-5.
- 24 Nissen A.K., Soede N.M., Hyttel P., Schmidt M. & D'hoore L. 1997. The influence of time of insemination relative to time of ovulation on farrowing frequency and litter size in sows, as investigated by ultrasonography. *Theriogenology*. 47:1571-1582.
- 25 Park C.S., Kim I.C. & Son D.S. 1999. Study on the optimal concentration of motile sperm per dose in the artificial insemination with liquid boar semen. In: *Abstracts of the 4th international conference on boar semen preservation*. (Beltsville, U.S.A.) p.34.
- 26 Pedersen P.N. 1991. Effect of number of sperm cells per insemination dose. In: *Supplement 1 of the 2nd International Conference On Boar Semen Preservation* (Beltsville, U.S.A.). p.398.
- 27 Popwell J.M. & Flowers L.W. 2004. Variability in relationships between semen quality and estimates of in vivo and in vitro fertility in boars. *Animal Reproduction Science*. 81: 97-113.
- 28 Reis G.R. 2002. Avaliação de machos suínos: sensibilidade ao resfriamento e capacidade de ligação espermática a um substrato sintético. 112f. Porto Alegre, RS. Dissertação (Doutorado em Ciências Veterinárias)-Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- 29 Rodríguez-Martínez H. & Eriksson B. 2000. Evaluación del semen de verracoy su relación com fertilidad. In: *3^o Simpósio Internacional MINITUB* (Flores da Cunha, Brasil). pp.13-33.
- 30 Ruiz-Sánchez A.L., O'donoghue R., Lebowa G., Foxcroft G.R., Dixon W.T. & Dyck M.K. 2007. Changes in sperm motility as an indicator of boar fertility. *Advances in Pork Production*. v.18. Disponível em: (<<http://www.banffpork.ca/proc/2007.shtml#16>>) Acessado em: janeiro de 2008.
- 31 Soede N.M., Wetzels C.C.H., Zondag W., de Koning M.A.I. & Kemp B. 1995. Effects of time of insemination relative to ovulation, as determined by ultrasonography, on fertilization rate and accessory sperm count in sows. *Journal of Reproduction and Fertility*. 104: 99-106.
- 32 Steverink D.W., Soede N.M., Bouwman E.G. & Kemp B. 1997. Influence of insemination-ovulation interval and sperm cell dose on fertilization in sows. *Journal of Reproduction and fertility*. 111: 165-171.
- 33 Vazquez J.L., Martínez E.A., Vazquez J.M., Lucas X., Gil M.A., Parrilla I. & Roca J. 1999. Development of a non-surgical deep intrauterine insemination technique. In: *Proceedings of the 4th International Conference on Boar Semen Preservation* (Beltsville, U.S.A.). p.262.
- 34 Vazquez J.M., Martínez E., Parrilla I., Cuello C., Gil M.A. & Lucas X. 2001. Deep intrauterine insemination in natural post-weaning oestrus sows. In: *Proceedings of the 6th International Conference on Pig Reproduction* (Columbia, U.S.A.). p.132.
- 35 Vazquez J.M., Martínez E.A., Roca J., Gil M.A., Parrilla I., Cuello C., Carvajal G., Lucas X. & Vazquez J.L. 2005. Improving the efficiency of sperm technologies in pigs: the value of deep intrauterine insemination. *Theriogenology*. 63:536-547.
- 36 Waberski D., Weitze K.F., Gleumes T., Schwarz M., Willmen T. & Petzoldt R. 1994. Effect of time insemination relative to ovulation on fertility with liquid and frozen boar semen. *Theriogenology*. 42:831-840.
- 37 Waberski D., Weitze K.F., Lietmann C., Lübbert Zur Lage W., Bortolozzo F.P., Willmen T. & Petzoldt R. 1994. The initial fertilizing capacity of longterm-stored liquid boar semen following pre- and post ovulatory insemination. *Theriogenology*. 41: 1367-77.
- 38 Watson P.F. & Behan J.R. 2002. Intrauterine insemination of sows with reduced sperm numbers: results of a commercially based field trial. *Theriogenology*. 57:1683-1693.
- 39 Weitze K. 1991. Long-term storage of extended boar semen. In: *Supplement 1 of the 2nd International Conference On Boar Semen Preservation* (Beltsville, U.S.A.). pp. 231-253.
- 40 Weitze K.F. & Muller E. 1991. Prinzipien der Sperma Untersuchung. In: Bush W., Löhle K., Peter W. (Eds) *Künstliche Besamung bei Nutztieren*. 2.ed. Jena: Gustav Fischer Verlag. pp. 269-310.
- 41 Woelders H. 1991. Overview of in vitro methods for evaluation of sêmen quality. In: *Supplement 1 of the 2nd International Conference On Boar Semen Preservation* (Beltsville, U.S.A.). pp.145-164.
- 42 Wolken A., Rath D., Bortolozzo F.P., Wentz I. & Marchetti A. 2002. Sows can successfully be inseminated non-surgically into the distal uterine horn with a highly reduced number of sperm cells. *Theriogenology*. 57: 392.
- 43 Xu X., Pommier S., Arbov T., Hutchings B., Sotto W. & Foxcroft G.R. 1998. In vitro maturation and fertilization techniques for assessment of semen quality and boar fertility. *Journal Animal Science*. 73: 3079-3089.
- 44 Xu X., Seth P.C., Harbison A.S., Cheung A.P. & Foxcroft G.R. 1996. Semen dilution for assessment of boar ejaculate quality in pig IVM and IVF systems. *Theriogenology*. 46: 1325-1337.