

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

**REDUÇÃO DO NÚMERO DE ESPERMATOZÓIDES POR FÊMEA SUÍNA
INSEMINADA POR ANO**

Tese de Doutorado

PAULO EDUARDO BENNEMANN

Porto Alegre
2005

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

**REDUÇÃO DO NÚMERO DE ESPERMATOZÓIDES POR FÊMEA SUÍNA
INSEMINADA POR ANO**

Paulo Eduardo Bennemann

Tese apresentada como requisito para
obtenção do grau de Doutor em
Ciências Veterinárias na área de
Reprodução Animal

Porto Alegre
2005

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

PAULO EDUARDO BENNEMANN

REDUÇÃO DO NÚMERO DE ESPERMATOZÓIDES POR FÊMEA SUÍNA
INSEMINADA POR ANO

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela comissão formada pelos doutores:

Prof. Dr. Fernando Pandolfo Bortolozzo
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Ilmo Wentz
Membro da Comissão

Prof. Dra. Fabiane Mendonça Ferreira
Membro da Comissão

Prof. Dr. Rui Fernando Felix Lopes
Membro da Comissão

Porto Alegre, 18 de março de 2005

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Em especial à minha esposa Patrícia e ao meu filho Gabriel, pelo amor, carinho e compreensão pelos momentos de ausência durante a execução desta tese.

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, pela oportunidade do doutorado.

Ao Prof. Dr. Fernando Pandolfo Bortolozzo, pela orientação e auxílio na elaboração desta tese, conhecimentos transmitidos, amizade e oportunidades a mim concedidas.

Ao Prof. Dr. Ivo Wentz, pela co-orientação, conhecimentos transmitidos e amizade.

A Prof. Dra. Mari Lourdes Bernardi, pela co-orientação, amizade, auxílio na análise estatística e na redação dos artigos dessa tese.

Ao Prof. Dr. David Barcellos pela amizade, conselhos e conhecimentos transmitidos.

Aos colegas e amigos Gustavo Nogueira Diehl, Elisane Milbradt e Felipe Koller, pessoas sem as quais não seria possível a execução dos experimentos apresentados nessa tese, e também pela amizade e tolerância mútua na realização dos trabalhos.

Aos colegas Alisson Schimidt, Daniela Weber, Lisiane Pires, Rosemary Vidor, Henrique Fries, pela amizade e auxílio na realização dos experimentos.

Aos amigos e colegas de Pós-graduação Vladimir Farias Borges, Rafael Kummer, Ricardo Pierozan, Alisson Mezalira, Djane Dallanora, Anamaria Vargas pelos bons momentos de estudo e descontração.

Em especial ao amigo e colega Evandro Poleze pelos conselhos, auxílio e momentos de descontração.

Aos bolsistas e voluntários do Setor de Suínos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Agradeço a todos.

A Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro.

A Perdigão Agroindustrial, pela oportunidade da realização de grande parte dos experimentos, a qual agradeço em nome dos Médicos Veterinários Valdir Beviláqua e Guilherme Brandt.

A Carroll's Foods do Brasil, em nome do Sr. Giovani Biassio e Médico veterinário Nelso Pasqual, pela oportunidade da execução de parte dos experimentos.

A Minitub do Brasil, em nome do Dr. Luiz Paulo Hoppe e Alexandre Marchetti, pelo auxílio e suporte dispensados nos experimentos.

A todas as pessoas que auxiliaram de alguma forma na elaboração desta tese, mesmo sem o saber ou terem sido citadas.

Muito Obrigado.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 Diluentes de Sêmen Suíno	16
2.2 Duração do Estro	16
2.3 Momento da Ovulação	17
2.4 Momento e Frequência da IA e Sobrevivência dos Gametas	19
2.5 Inseminação Artificial Tradicional	20
2.6 Inseminação Artificial Intra-Uterina	21
2.6.1 Aplicabilidade Prática da Inseminação Intra-Uterina	23
2.7 Vantagens e Limitações da Inseminação Intra-Uterina	24
EXPERIMENTO 1: Artificial Insemination of Gilts With 1,5 Billion Sperm Stored in Different Periods Associated to Different Pre-Ovulatory Intervals	27
EXPERIMENTO 2: Reproductive performance of sows submitted to intrauterine insemination at different pre-ovulatory intervals	41
EXPERIMENTO 3: Desempenho Reprodutivo de Fêmeas Suínas Submetidas à Inseminação Artificial Intra-uterina ou Tradicional	56
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	68
4. CONCLUSÕES	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

LISTA DE TABELAS

EXPERIMENTO 1

Table 1: Pregnancy Rate (PR), number of corpora lutea (CL), number of total embryos (TE) and embryo survival (ES) in gilts inseminated at different insemination-ovulation (AIOV) intervals.	39
---	----

EXPERIMENTO 2

Table 1- Pregnancy Rate (PR), Corpora Lutea (CL), Total Embryos (TE) and Embryo survival (ES) in sows submitted to one intrauterine insemination with 1 or 2×10^9 spermatozoa at 0-24 or 25-36 h before ovulation.....	55
---	----

EXPERIMENTO 3

Tabela 1: Taxa de prenhez (TPr), taxa de parto ajustada (TPA) e tamanho da leitegada (TL) de fêmeas inseminadas pela técnica intra-uterina (IAU) ou tradicional (IAT).	66
Tabela 2: Taxa de prenhez (TPr), taxa de parto ajustada (TPA) e tamanho da leitegada (TL) de fêmeas com presença ou ausência de sangue na inseminação intra-uterina.	67

LISTA DE FIGURAS

Experimento 1

Figure 1: Embryonic survival distribution in gilts inseminated at different pre-ovulatory periods with semen dose of 1.5 billion sperms stored up to 120 hours.....	40
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
AIOV	Artificial insemination-ovulation
Bi	Billion
BTS	Beltsville Thawing Solution
CL	Corpora lutea (Corpos lúteos)
DI	Dose inseminante
DLACT	Duração da lactação
ECV	Escore corporal visual
ES	Embryo survival
FR	Farrowing rate
H	Hour (Horas)
IA	Inseminação artificial
IAOV	Intervalo inseminação-ovulação
IAT	Inseminação artificial tradicional
IAU	Inseminação artificial intra-uterina
IDE	Intervalo desmame-estro
IUI	Intrauterine insemination
mL / ml	Mililitros
Mm	Milímetro
NV	Nascidos Vivos
OP	Ordem de parto
PR	Pregnancy rate
SD	Semen dose
ST	Storage time
TE	Total embryos
TL	Tamanho da leitegada
TP	Taxa de parto
TPA	Taxa de parto ajustada
TPr	Taxa de prenhez
XLT	Média do tamanho da leitegada dos partos anteriores

RESUMO

Redução do Número de Espermatozóides Por Fêmea Suína Inseminada por Ano¹

Autor: Paulo Eduardo Bennemann

Orientador: Prof. Dr. Fernando Pandolfo Bortolozzo

Co-orientadores: Prof. Dr. Ivo Wentz

Profa. Dra. Mari Lourdes Bernardi

Na inseminação artificial de suínos, são utilizados de 9 a 12 bilhões de espermatozóides por fêmea inseminada. A utilização de menor número de espermatozóides, sem interferir na performance reprodutiva das fêmeas, poderia otimizar o uso dos machos e reduzir os custos de inseminação. Esta tese foi dividida em três experimentos para avaliar o efeito da redução do número de espermatozóides por fêmea inseminada com a técnica tradicional ou intra-uterina. No experimento 1 foram utilizadas 218 leitoas Camborough 22[®] inseminadas em três intervalos antes da ovulação (0-12, 13-23 e 24-30 h), com doses inseminantes contendo 1,5 bilhão de espermatozóides e armazenadas por 0-48 h ou 96-120 h. As leitoas receberam uma única inseminação. As fêmeas foram abatidas aos 30,8±3,7 dias de gestação e o trato genital foi removido para contagem do número de corpos lúteos e embriões totais. A taxa de prenhez foi influenciada pelo intervalo inseminação-ovulação quando o sêmen foi armazenado por 96-120 h ($P<0,05$). Da mesma forma, a interação tempo de armazenamento do sêmen e o intervalo inseminação-ovulação afetou ($P<0,05$) o número de embriões totais e a sobrevivência embrionária. Quando o período de armazenamento do sêmen foi de 120 h e o intervalo inseminação-ovulação de 24-30 h, foi observada redução no número de embriões totais e na sobrevivência embrionária. No experimento 2 foi avaliado o efeito do intervalo inseminação-ovulação e do número de espermatozóides na dose inseminante em fêmeas submetidas à inseminação intra-uterina. Foram utilizadas 66 matrizes pluríparas da linhagem Camborough 22[®]. As fêmeas foram distribuídas em quatro tratamentos (doses de 1 ou 2 bilhões de espermatozóides diluídos em 60 ml e intervalo inseminação-ovulação de 0-24 e 25-36 h). As fêmeas receberam uma única inseminação intra-uterina. No momento da inseminação, não foi observado refluxo de sêmen. A passagem do cateter pela cérvix foi possível em todas as fêmeas. Foi observada presença de sangue em 1,7% das fêmeas. Aos 31±4,3 dias de gestação, as fêmeas foram abatidas e o trato genital foi removido para a contagem dos corpos lúteos e número de embriões totais. A taxa de prenhez e a sobrevivência embrionária não foram afetadas pelo número de espermatozóides ou pelo intervalo inseminação-ovulação. O número de embriões totais não foi influenciado pelo número de espermatozóides, mas foi reduzido para o intervalo inseminação-ovulação de 25-36 h comparado a 0-24 h ($P<0,05$). No experimento 3 foram utilizadas 298 fêmeas Camborough 22[®] com o objetivo de comparar o desempenho reprodutivo de fêmeas submetidas à inseminação intra-uterina e a tradicional. As fêmeas foram distribuídas em dois tratamentos: T1 – inseminação intra-uterina com doses inseminantes contendo 0,5 bilhão de espermatozóides em um volume total de 20 ml; T2 - inseminação tradicional com doses inseminantes contendo 3,0

bilhões de espermatozoides em um volume total de 90 ml. As fêmeas receberam múltiplas inseminações. Foi possível a realização da inseminação intra-uterina em 98,1% das fêmeas. A presença de sangue, na extremidade do cateter ou espiral da pipeta de inseminação intra-uterina, foi observada em 8,4 % das fêmeas. As taxas de prenhez e de parto ajustada não diferiram entre os tratamentos. No entanto, o tamanho da leitegada foi menor ($P < 0,05$) na IAU quando comparado à tradicional. Na inseminação artificial tradicional, em leitoas, é possível utilizar 1,5 bilhão de espermatozoides sem que as taxas de prenhez, número de embriões totais e sobrevivência embrionária sejam comprometidas. Para a inseminação intra-uterina, a utilização de 1 bilhão de espermatozoides não compromete o desempenho reprodutivo.

¹ Tese de Doutorado em Ciências Veterinárias
Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias
Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
Porto Alegre, 18 de março de 2005.

ABSTRACT

Sperm Reduction per Swine Female Inseminated per Year¹

Author: Paulo Eduardo Bennemann

Advisor: Prof. Dr. Fernando Pandolfo Bortolozzo

Co-Advisor: Prof. Dr. Ivo Wentz

Prof. Dra. Mari Lourdes Bernardi

In artificial insemination of swine, 9 to 12 billion sperm are used for female inseminated. Using a low sperm number, without affecting the reproductive performance of female, could optimize the use of males and reduce the costs of insemination. This thesis was divided in three experiments to evaluate the effect of the reduction in sperm number per female inseminated with the traditional or intrauterine technique. In experiment 1, 218 Camborough 22[®] gilts were inseminated at three insemination-ovulation intervals before ovulation (0-12, 13-23 and 24-30 h) with 1.5 billion semen dose stored for 0-48 h or 96-120 h. Gilts were inseminated once. Pregnant gilts were slaughtered at 30.8 ± 3.7 days of gestation and their genital tract was removed and corpora lutea and total embryos were counted. Pregnancy rate was affected by insemination-ovulation interval when semen doses were stored for 96-120 h ($P < 0.05$). Similarly, storage time and insemination-ovulation interval interaction affected the total embryos and embryo survival ($P < 0.05$). It was observed a reduction in total embryos and embryo survival when semen was stored up to 120 h and insemination-ovulation interval was higher than 24-30 h. In experiment 2 it was evaluated the effects of insemination-ovulation interval and sperm cells number on sows submitted to intrauterine insemination. A total of 66 pluriparous sows Camborough 22[®] was utilized. The sows were grouped in four treatments (1 or 2 billions sperm dose diluted in a total volume of 60 ml and insemination-ovulation interval of 0-24 or 25-36 h). All sows were inseminated once. Semen backflow during insemination did not occur. It was possible to insert the flexible catheter through the cervix in all sows. The presence of blood in the catheter tip was observed in 1.7% of sows. At 31.7 ± 4.3 days of gestation, sows were slaughtered and their genital tract was removed and corpora lutea and total embryos were counted. The pregnancy and embryo survival rates were not affected by sperm number or insemination-ovulation interval. Total embryos was not affected by sperm numbers, but it was reduced when artificial insemination-ovulation interval was 25-36 h in comparison to 0-24h ($P < 0.05$). In experiment 3, 298 sows Camborough 22[®] were used. The aim of this study was to compare the reproductive performance of sows submitted to intrauterine or traditional artificial insemination. The sows were distributed in two treatments: T1 – intrauterine insemination performed with 0.5 billion sperm doses in a total volume of 20 ml; T2 – traditional insemination performed with 3.0 billions sperm doses in a total volume of 90 ml. Sows received several inseminations. It was possible to perform the intrauterine insemination in 98.1% of sows. The presence of blood on the intrauterine insemination catheter tip or pipette

was observed in 8.4 % of sows. Pregnancy and adjusted farrowing rates did not differ between treatments. However, litter size was lower ($P<0.05$) in intrauterine than in traditional insemination. In gilts, traditional insemination can be performed with 1.5 billion sperm without compromising their pregnancy rate, number of total embryos and embryo survival. For intrauterine insemination is possible to utilize 1 billion sperm without affecting the reproductive performance.

¹ Doctoral Thesis in Veterinary Sciences
Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias
Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
Porto Alegre, march 18th, 2005

1. INTRODUÇÃO

Na suinocultura moderna, exigências de mercado e a busca por melhor desempenho reprodutivo apontam para a necessidade de obter animais que, através do emprego de novas tecnologias, possam expressar o máximo de seu potencial genético. A inseminação artificial (IA) surgiu como uma biotécnica capaz de melhorar a produtividade e rentabilidade de granjas de suínos tecnificadas. No entanto, apesar de ser um procedimento simples, se não for conduzido no momento adequado e de forma correta, pode reverter seus benefícios tornando-se um fator limitante nos resultados de produção de uma granja suinícola (BORTOLOZZO e WENTZ, 1995).

As vantagens advindas da IA, principalmente no que se refere ao ganho genético (maior rendimento de carcaça, melhoria da eficiência alimentar, maior ganho de peso), são indiscutíveis. Segundo Weitze (2000), mundialmente, a IA representa mais de 80% das coberturas realizadas em suínos, demonstrando a importância desta biotécnica na suinocultura moderna. No Brasil, no entanto, apenas 51% das fêmeas suínas são inseminadas artificialmente (WENTZ *et al.*, 2000).

Na IA, por ser utilizada uma quantidade inferior de espermatozoides na dose inseminante (3 bilhões), quando comparada à monta natural (até 100 bilhões), há a necessidade de uma atenção especial principalmente no que diz respeito ao momento e a frequência da sua execução. Na prática, é comum a execução de 3 ou até mesmo 4 inseminações por estro por fêmea, com intervalos de 8 a 16 horas entre as mesmas. Isso se deve à dificuldade de prever o momento ideal da IA, ou seja, o momento mais próximo possível da ovulação. Assim, a IA ocorre independentemente se a ovulação já aconteceu ou não. Segundo Castagna *et al.* (2003), na rotina de granjas comerciais de suínos, mais de 70% das fêmeas recebem pelo menos uma inseminação após a ovulação, independentemente da frequência de realização das inseminações. Desta forma, quanto maior a frequência de IA recebidas pelas fêmeas durante o estro, maior é a probabilidade da realização de IAs pós-ovulatórias.

O aumento do intervalo entre as inseminações, com conseqüente redução do número de doses para inseminar uma matriz, tem sido alvo de estudos. Tal possibilidade traria benefícios relacionados à diminuição do custo da fêmea inseminada e melhor aproveitamento dos machos geneticamente superiores.

Trabalhos demonstram que é possível obter boas taxas de fecundação inseminando pluríparas em períodos de até 24 horas antes da ovulação (SOEDE *et al.*, 1995a; SOEDE *et al.*, 1995b). Com base nesses resultados pode-se inferir que uma população espermática permanece viável no trato genital feminino pelo menos até 24 horas, sendo possível a execução de uma única IA diária. No entanto, para leitoas este intervalo ainda é controverso. Segundo Waberski *et al.* (1994b), o intervalo inseminação-ovulação ideal para leitoas seria de até 12 horas. No entanto, Uemoto (1999) não observou diferença na taxa de prenhez de leitoas inseminadas até 24 horas antes da ovulação.

Nos últimos 40 anos, continua sendo preconizada a utilização de uma dose inseminante contendo 3 a 4 bilhões de espermatozóides (POLGE, 1956; BAKER; DZIUK; NORTON, 1968). No entanto, a redução do número de espermatozóides por dose em até 50%, ou seja, 1,5 bilhões de espermatozóides/dose, ou até menos, pode representar um ganho econômico considerável sem acarretar problemas de fertilidade (WATSON e BEHAN, 2002). Segundo Martinez *et al.* (2001) e Rath; Krueger; Johnson (2000), o número de espermatozóides utilizados por dose inseminante na inseminação artificial pode ser reduzido se o mesmo for depositado além da cérvix. Nesse sentido, surgiram propostas de alterações na técnica de deposição do sêmen no trato genital feminino. A proposta tem sido a de realizar uma inseminação artificial intra-uterina (IAU) baseada na deposição dos espermatozóides diretamente no lúmen uterino. No entanto, como todas as outras biotécnicas, a IAU ainda apresenta limitações. Assim, o aperfeiçoamento desta técnica, bem como a redução do número de espermatozóides por cobertura em leitoas, e a sua validação a campo é de extrema importância para tornar a suinocultura cada vez mais competitiva.

O objetivo deste estudo foi avaliar a possibilidade da redução do número de espermatozóides necessários por fêmea inseminada, além de verificar o efeito do envelhecimento *in vitro* dos espermatozóides em leitoas e determinar o melhor intervalo inseminação-ovulação na inseminação intra-uterina. O estudo foi dividido em três etapas: I. Inseminação artificial em leitoas com sêmen armazenado por diferentes intervalos associado a diferentes períodos pré-ovulatórios; II. Performance reprodutiva de porcas submetidas à inseminação artificial intra-uterina em diferentes intervalos pré-ovulatórios; e III. Desempenho reprodutivo de fêmeas suínas submetidas à inseminação artificial intra-uterina ou tradicional.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Diluentes de Sêmen Suíno

Os diluentes utilizados na IA de suínos são classificados, com base no período de manutenção da viabilidade e capacidade fecundante do espermatozóides, em diluentes de curta (1 a 2 dias) e de longa (6 a 7 dias) duração (LEVIS, 2000).

Dados referentes ao período de conservação da motilidade espermática, taxas de prenhez e de parto relacionando diluentes de curta e longa duração são controversos. Embora o BTS seja considerado um diluente de curta duração, vários autores observaram que mais de 60% dos espermatozóides apresentavam-se móveis mesmo após 96 horas de armazenamento (SCHEIDT *et al.*, 1993; BALTES, 1993; REIS *et al.*, 2000; OHATA, 2001). Por outro lado, Sather; Harbison; Seth (1991) verificaram redução na taxa de concepção para o sêmen armazenado em BTS por mais de 72 horas em comparação ao armazenado por até 72 horas ($P < 0,05$).

Segundo Weitze (1991), quando a dose inseminante (DI) é armazenada por períodos superiores a 72 horas, mesmo com o emprego de diluentes de longa duração como Androhep, MR-A e Reading, a taxa de parto e o tamanho da leitegada podem ser afetados.

Laforest e Allard (1996) compararam diferentes diluentes ao longo de 168h (BTS, MR-A, Modena e Androhep) e concluíram que o BTS é tão eficiente quanto os diluentes mais complexos. Nas 96h, todos os diluentes avaliados apresentaram taxa de prenhez que variou de 83 a 89%, sem diferença significativa entre eles ($P > 0,05$).

2.2 Duração do Estro

O estro é tido como o período em que a fêmea suína demonstra reflexo de imobilidade na presença de um macho e mantém-se receptiva ao acasalamento (SOEDE e KEMP, 1997). A duração do estro é bastante variável entre fêmeas, podendo ser de 24 até mais de 96 horas (SOEDE e KEMP, 1997). Essa variação entre animais é observada em, praticamente, todos os rebanhos e está associada a características individuais, genética, ordem de parto, manejo e intervalo desmame-estro, além de outros fatores, como nutrição, sanidade, estresse, época do ano (DIAL *et al.*, 1992; VESSEUR, 1997).

Apesar da duração média do estro subsequente ser semelhante no rebanho, o mesmo não ocorre com o indivíduo. Segundo Soede e Kemp (1997), somente 29% das

fêmeas repetem a mesma duração de estro, fazendo com que o registro desse parâmetro tenha pouca aplicabilidade.

Segundo Weitze *et al.* (1994), a duração do estro em fêmeas pluríparas variou de 32 a 96 horas, com uma média de $59,6 \pm 14,8$ horas. Marchetti (2001) observou um período de estro de 24 a 112 horas ($62,6 \pm 11,5$). Steverink *et al.* (1999), também com pluríparas, observaram uma duração de estro que variou de 32 a 69 horas ($50,1 \pm 1,1$ hora). No entanto, quando Steverink *et al.* (1999) avaliaram o mesmo parâmetro em leitoas, observaram que a duração do estro foi menor, ou seja, $41,2 \pm 1,0$ horas com uma amplitude de 19 a 52 horas. Para Uemoto (1999), a duração de estro em nulíparas foi de $50,4 \pm 10,9$ horas com uma amplitude de 24 a 72 horas. Estes dados demonstram a grande variabilidade e amplitude na duração do estro, em diferentes rebanhos, conforme citado por Soede e Kemp (1997).

2.3 Momento da Ovulação

A capacidade de prever o momento em que a ovulação irá ocorrer é ponto fundamental para que se possa identificar o período ideal da inseminação artificial. Com o advento da ultra-sonografia foi possível o acompanhamento da dinâmica folicular de maneira não invasiva, o que possibilitou a realização de inúmeros estudos relacionados ao momento da ovulação (WEITZE *et al.*, 1994).

A ovulação ocorre, em média, transcorridos 64% (SOEDE *et al.*, 1995b) a 72% (SOEDE *et al.*, 1995a) da duração do estro, ou seja, próximo ao início do terço final do estro. Heck *et al.* (1997) evidenciaram uma correlação positiva, que explicaria até 68 % da variação do momento da ovulação, conforme a duração do estro ($P < 0,001$). Infelizmente, esta informação é retrospectiva, ou seja, o conhecimento da relação entre o momento da ovulação e a duração do estro só está disponível após o término do estro.

A partir de vários experimentos, têm sido constatados diferentes intervalos médios entre o início do estro e a ovulação, como 45 ± 13 horas (WEITZE *et al.*, 1994), 35 ± 8 horas (SOEDE *et al.*, 1995a) e 42 ± 13 horas (NISSEN *et al.*, 1997).

Wentz *et al.* (1997), estudando o momento da ovulação em duas linhagens genéticas (Camborough 15 e Camborough 22) observaram que o mesmo ocorreu transcorridos $29 \pm 1,7$ e $32 \pm 1,6$ horas do início do estro. Uemoto (1999), trabalhando com nulíparas, observou que o momento da ovulação ocorreu, em média, 34 ± 9 horas após o início do estro, o qual apresentou uma amplitude de 16 a 72 horas.

Devido à variabilidade observada entre o início do estro e momento da ovulação, vários experimentos tentaram relacionar o momento da ovulação com algumas características físicas e comportamentais do estro, como condutividade do muco vaginal (STOKHOF; SOEDE; KEMP, 1996), temperatura corporal (SOEDE e KEMP, 1997), reflexo de tolerância ao homem na presença do macho (SOEDE; WETZELS; KEMP, 1996; UEMOTO, 1999) e reflexo de tolerância ao homem (SOEDE e KEMP, 1997; UEMOTO, 1999). No entanto, estas técnicas demonstraram pouco valor, tendo baixa correlação com o momento da ovulação. Até o momento, o melhor preditor do momento da ovulação é a duração do estro.

Em média, a ovulação ocorre no início do terço final do estro, sendo, portanto, uma informação retrospectiva. Segundo Weitze *et al.* (1994), a duração do estro pode ser influenciada pelo intervalo desmame-estro e, baseados nessa informação, propuseram uma estratégia de inseminação para fêmeas desmamadas. Para fêmeas com intervalo desmame-estro curto (até 3 dias) a primeira inseminação deveria ser realizada somente 24 horas após o diagnóstico do estro. Para fêmeas com intervalo desmame-estro de 4 a 6 dias, a primeira inseminação deveria ser realizada 12 horas após o diagnóstico do estro. Por fim, fêmeas com intervalo desmame-estro longo (>6 dias) deveriam receber a primeira inseminação logo após o momento do diagnóstico do estro. No entanto, em alguns rebanhos, a correlação entre intervalo desmame-estro e momento da ovulação, não tem sido confirmada. Castagna (2000) observou que, em fêmeas com intervalo desmame-estro longo, a ovulação foi tão precoce quanto para as fêmeas com intervalo desmame-estro curto.

Segundo Soede e Kemp (1997), 10% das fêmeas ovularam antes de 24 horas do início do estro. Avaliando um rebanho nacional, Heck *et al.* (1997) observaram que esse percentual foi de 20% das fêmeas, independentemente do intervalo desmame-estro. Wentz *et al.* (1997) e Uemoto (1999) observaram que 6,9 e 18,2% das leitoas, respectivamente, ovularam em até 24 horas após o início do estro. No estudo de Castagna; Bortolozzo; Wentz (2001), esse percentual chegou até 30,6% das leitoas avaliadas. Essa constatação pode fazer com que a proposta de Weitze *et al.* (1994) fique comprometida, devido ao fato de que esse percentual de fêmeas poderia receber a primeira inseminação após a ovulação.

2.4 Momento e Frequência da IA e Sobrevivência dos Gametas

Segundo Soede *et al.* (1995a), o melhor momento para a realização da inseminação artificial é o mais próximo da ovulação, sendo que os resultados do desempenho reprodutivo dependem do número de espermatozóides viáveis no sítio de fecundação, no momento da ovulação. O intervalo tido como ótimo para realização da inseminação artificial, em pluríparas, é de até 24 horas antes da ovulação pois, após esse período, existe comprometimento na taxa de parto e tamanho de leitegada (SOEDE *et al.*, 1995a, SOEDE *et al.*, 1995b). Para Nissen *et al.* (1997), no entanto, este intervalo pode ser estendido até 28 horas antes da ovulação e até 4 horas após a ovulação.

Em nulíparas, os estudos do momento ótimo para a realização da inseminação têm apresentado resultados conflitantes. Waberski *et al.* (1994a) observaram que o intervalo ótimo entre IA e ovulação foi de 12 horas. No entanto, no estudo de Waberski *et al.* (1994a) foram utilizadas apenas 5 leitoas com intervalo inseminação-ovulação superior a 12 horas. Dessa forma, a interpretação desse resultado pode ficar comprometida devido ao pequeno número de observações. Em outro estudo, Uemoto (1999) observou que, quando a inseminação era realizada em um intervalo de até 24 horas antes da ovulação, a taxa de prenhez e número de embriões não foram afetados. Segundo Kemp e Soede (1997), as células espermáticas sobrevivem por mais de 44 horas no trato genital, porém, se a IA é conduzida em intervalo superior a 24 horas antes da ovulação, a taxa de fecundação é baixa. Segundo os autores, uma possível explicação para este fenômeno é de que o número de espermatozóides viáveis, aptos à fecundação, diminui ao longo do tempo e isso seria um fator limitante para o sucesso da fecundação.

Quando a inseminação é realizada após a ovulação, há problemas de envelhecimento do gameta feminino (HUNTER, 1994; SOEDE e KEMP, 1997), pois além do período transcorrido da inseminação até o momento da ovulação, deve ser acrescentado o período que os espermatozóides necessitam para a capacitação e ocupação dos sítios de fecundação (SOEDE *et al.*, 1995a). Segundo Hunter (1967), a viabilidade funcional do oócito se mantém por até 8 horas. No entanto, apesar da capacidade de fecundação ser considerada normal durante esse período, foi observada maior perda embrionária aos 25 dias de gestação.

Como não existem meios práticos para predizer o momento da ovulação, há uma grande dificuldade em realizar a inseminação próxima a esse momento. Tradicionalmente, para assegurar que ao menos uma inseminação seja realizada dentro

do período considerado ótimo, aumenta-se a frequência das inseminações (FLOWERS e ESBENSHADE, 1993), ou seja, são realizadas múltiplas IAs ao longo do estro. Nesse sentido, existem várias propostas de programas com duas ou três inseminações, distribuídas ao longo do estro, como sendo suficientes para garantir uma alta fecundidade. Segundo Bortolozzo e Wentz (1995), a realização do diagnóstico de estro duas vezes por dia, com a realização da primeira inseminação artificial no turno seguinte e repetições a cada 12 horas é a forma recomendável de manejo reprodutivo. Com esse manejo existe uma grande utilização de doses inseminantes, implicando em menor utilização de machos de alta qualidade genética, maior desgaste dos machos, mais gastos com equipamentos e materiais de consumo dentro da central de inseminação artificial, maior custo com mão-de-obra, instalações, medicamentos e possibilidade de inseminações pós-ovulatórias.

Castagna (2002), trabalhando em dois rebanhos suínos, não observou diferenças na taxa de retorno ao estro e na taxa de parto de fêmeas submetidas a uma ou duas inseminações ao dia. Dessa forma, uma diminuição na frequência de inseminações, aumentando o intervalo para 24 horas, quando aplicada em associação a um diagnóstico de estro adequado e sêmen de boa qualidade, pode levar a bons resultados reprodutivos, com economia de mão-de-obra e de doses inseminantes (CASTAGNA, 2002).

2.5 Inseminação Artificial Tradicional

A IA na espécie suína teve o seu início na década de 30, no Japão e na Rússia (WENTZ e BORTOLOZZO, 1998). Durante as décadas de 50 e 60, estudos com o transporte espermático em nulíparas e pluríparas inseminadas com diferentes volumes e número de espermatozóides demonstraram que eram necessários no mínimo 5 bilhões de espermatozóides em 100 ml para alcançar bons índices de fecundação (STRATMAN e SELF, 1960; BAKER; DZIUK; NORTON, 1968). Quarenta anos se passaram e o número de espermatozóides e o volume da DI, na inseminação tradicional, ainda são muito semelhantes aos adotados inicialmente. Outros estudos foram conduzidos tentando estabelecer o volume e número mínimo de espermatozóides (STEVERINK *et al.*, 1997; MARCHETTI, 2001; BRACKEN *et al.*, 2003) capazes de levar a uma boa taxa de prenhez e tamanho da leitegada, mas, os resultados foram controversos.

Stratman e Self (1960) observaram, em leitoas inseminadas com 2,5, 5 e 10 bilhões de espermatozóides em volumes de 10, 20 e 50 ml (fatorial 3 x 3), abatidas aos

25 dias de gestação, que o número de espermatozóides utilizados não influenciou a sobrevivência embrionária e a taxa de concepção. No entanto, volumes inferiores a 50 ml afetaram de forma negativa esses parâmetros.

Steverink *et al.* (1997) inseminaram porcas pluríparas com 1, 3 e 6 bilhões de espermatozóides em 80 ml e não observaram efeito positivo do aumento do número de espermatozóides, de 1 para 3 bilhões e de 3 para 6 bilhões, no número de embriões.

Marchetti (2001) utilizou inseminações com doses inseminantes de 2, 3 e 4 bilhões de espermatozóides, em 95 ml, e não observou diferença na taxa de retorno ao estro e taxa de parto ajustada. No entanto, o número de leitões nascidos totais diminuiu quando foram realizadas inseminações com 2 bilhões de espermatozóides em comparação a 3 e 4 bilhões.

Existem indícios de que o número de espermatozóides contidos na dose inseminante, bem como o volume utilizado, podem ser reduzidos para valores inferiores aos atuais 3 bilhões em 100 ml. No entanto, para que isso possa ser aplicado, é necessário que pontos críticos, como a qualidade do ejaculado e da IA propriamente dita, estejam controlados.

2.6 Inseminação Artificial Intra-Uterina

Os primeiros relatos da inseminação artificial intra-uterina de forma não cirúrgica, em suínos, datam da década de 50, quando Hancock (1959) sugeriu que o local de deposição do sêmen tinha grande influência nos resultados de fecundação. Hancock (1959) trabalhou com a deposição de sêmen no trato genital das fêmeas, em três locais distintos, com doses inseminantes de 100 ml de sêmen não diluído, em uma única inseminação, e observou taxas de prenhez de 57,1%, 50,0% e 96,3% para a deposição vaginal, cervical e uterina, respectivamente. Em outro estudo, Hancock e Hovel (1961), trabalhando com inseminação intra-uterina com 20 ml, observaram taxas de fecundação de 80,9%, 81,2% e 19,8% com doses inseminantes de 10×10^9 , 1×10^9 e $0,1 \times 10^9$ espermatozóides, respectivamente, não havendo diferença entre 10×10^9 e 1×10^9 espermatozóides. Esse dado reforça a hipótese de Hancock (1959) de que, na inseminação intra-uterina, seria possível a redução do número de espermatozóides e do volume da dose inseminante sem prejuízo à taxa de fecundação.

Apesar dos resultados de Hancock (1959) e Hancock e Hovel (1961) terem demonstrado a possibilidade da utilização da inseminação intra-uterina com reduzido

número de espermatozóides e volume da dose inseminante, somente no final da década de 90 o tema foi retomado.

Segundo Rath; Krueger; Johnson (2000), existem várias maneiras de reduzir perdas de células espermáticas que ocorrem no momento da inseminação até a chegada ao sítio de fecundação. Dentre elas podem ser citadas: diminuir o refluxo da dose inseminante durante a inseminação; prover um rápido transporte espermático até o reservatório na junção útero-tubárica; proteger as células espermáticas contra reações imunológicas e depositar as células espermáticas próximas à junção útero-tubárica. Com exceção da deposição espermática na junção útero-tubárica, as demais possibilidades são dependentes, em parte, da própria fêmea, de estímulos externos e reações fisiológicas de cada indivíduo.

Segundo Martinez *et al.* (2001), o número de espermatozóides utilizados por dose inseminante pode ser reduzido se o mesmo for depositado além da cérvix. Nesse sentido, foram propostas alterações na técnica de deposição do sêmen no trato genital feminino. Esta biotécnica foi baseada na deposição dos espermatozóides diretamente no lúmen uterino, mais especificamente no corno uterino, o que permitiu a redução significativa do número de espermatozóides por dose inseminante.

Krueger e Rath (2000), trabalhando com doses inseminantes contendo 5×10^8 , 1×10^8 e 1×10^7 espermatozóides depositados cirurgicamente no corno uterino a 5 cm da junção útero-tubárica, demonstraram não haver diferença entre as taxas de prenhez, de parto e tamanho de leitegada em comparação à inseminação tradicional com 3×10^9 espermatozóides. No entanto, o procedimento cirúrgico inviabiliza a utilização da técnica para fins comerciais. Trabalhos realizados em bovinos (SEIDEL *et al.*, 1997) e eqüinos (MORRIS; HUNTER; ALLEN, 2000) demonstram que é possível realizar com sucesso uma inseminação artificial intra-uterina, de forma não cirúrgica, com reduzido número de espermatozóides. A complexidade anatômica do trato genital da fêmea suína constituía o principal obstáculo para a realização de um procedimento não cirúrgico devido ao comprimento e dobras do corno uterino. No entanto, Martinez *et al.* (2001), utilizando um endoscópio flexível, conseguiram transpor a barreira cervical e uterina depositando, assim, os espermatozóides diretamente no corno uterino. Os autores demonstraram não haver diferença na taxa de parto e tamanho da leitegada em fêmeas inseminadas de forma intra-uterina profunda com doses inseminantes contendo $1,5 \times 10^8$ e $1,0 \times 10^7$ espermatozóides quando comparada à inseminação tradicional com 3×10^9

espermatozóides. Outros autores também demonstraram que, na inseminação artificial intrauterina profunda, a dose inseminante pode conter até 50 milhões de espermatozóides sem que haja redução no desempenho reprodutivo da fêmea quando comparado a doses com 2 e 3 bilhões de espermatozóides empregando-se a técnica tradicional de inseminação (ROCA *et al.*, 2002; VASQUEZ *et al.*, 2002). Além da redução do número de espermatozóides por dose inseminante, há a redução do volume final da dose inseminante em 90%, pois seriam utilizados 10 ml ao invés de 100 ml.

Wolken *et al.* (2002) utilizaram uma única inseminação durante o estro com doses de 500 milhões ou 100 milhões de espermatozóides, ambas em um volume de 20 ml ou 100 milhões em 10 ml, e não observaram diferença nas taxas de prenhez (77,3%, 65,2% e 61,5%, respectivamente) e no número de embriões viáveis (12,6, 12,5 e 11,3 embriões viáveis, respectivamente) entre os grupos.

Mezalira *et al.* (2003a), inseminando fêmeas com uma única dose de 1 bilhão, 500 milhões ou 250 milhões de espermatozóides, em 20 ml, realizada em um intervalo de 0 a 24 h antes da ovulação, observaram que é possível a obtenção de taxas de prenhez superiores a 85% e 14 embriões com a deposição intra-uterina de 500 milhões de espermatozóides.

2.6.1 Aplicabilidade Prática da Inseminação Intra-Uterina

A inseminação intra-uterina é uma técnica simples de ser aplicada e, com o mínimo de treinamento, os funcionários da granja podem executá-la (GIL; TORTADES; ALEVIA, 2002; WATSON e BEHAN, 2002). No entanto, poucos trabalhos têm sido realizados em condições práticas de granja, utilizando protocolos de inseminação semelhantes aos tradicionalmente empregados.

Watson e Behan (2002) conduziram um experimento em condições de granja com 3.230 fêmeas pluríparas, utilizando doses de 1, 2 e 3 bilhões de espermatozóides em 80 ml, com inseminação tradicional ou intra-uterina. Os autores não observaram diferenças na taxa de parto com 1 (86,9%), 2 (92,5%) e 3 (90,5%) bilhões de espermatozóides na IAU e 2 (91,8%) e 3 (91,1%) bilhões na inseminação artificial tradicional (IAT), quando as duas técnicas foram comparadas. No entanto, 1 bilhão de espermatozóides na IAT resultou em taxa de parto (65,8%) menor em relação aos outros tratamentos. O tamanho da leitegada não diferiu entre a IAU com 1 (12,1), 2 (12,3) e 3 (12,3) bilhões de espermatozóides e IAT com 2 (12,6) e 3 (12,5) bilhões. Quando as

inseminações foram realizadas com 1 bilhão de espermatozóides, na IAT, o tamanho de leitegada (10,3) foi significativamente menor ($P < 0,001$) em comparação às outras.

Trabalhando com 608 matrizes, submetidas à IAU com doses de 1,5 bilhões de espermatozóides e IAT com 3 bilhões, em uma rotina de granja, Dallanora *et al.* (2005) não observaram diferenças na taxa de parto e tamanho da leitegada ao comparar a IAU (92,8%, $11,6 \pm 2,6$) e IAT (93,4%, $11,8 \pm 2,8$).

2.7 Vantagens e Limitações da Inseminação Intra-Uterina

A inseminação artificial intra-uterina, quando comparada à IAT, apresenta inúmeras vantagens, dentre elas:

- Menor refluxo de sêmen durante a inseminação artificial.

Steverink *et al.* (1998) demonstraram que o refluxo de sêmen ocorrido durante a inseminação artificial tradicional afeta negativamente a taxa de fecundação em fêmeas suínas. Os autores observaram que, em até 2,5 horas após a inseminação artificial, foi possível recuperar, no refluxo, $70 \pm 3,4\%$ do volume e $25 \pm 1,4\%$ do número de espermatozóides inseminados. O refluxo após a inseminação artificial não teve efeito nos resultados de fecundação em fêmeas inseminadas com $1, 3$ e 6×10^9 espermatozóides. No entanto, quando o mesmo ocorreu durante a inseminação, o número de embriões normais foi significativamente menor ($P < 0,05$) nas fêmeas inseminadas com 1×10^9 espermatozóides (46%, 89% e 97% respectivamente). Dallanora *et al.* (2004) compararam o percentual de volume e de espermatozóides refluídos na inseminação intra-uterina e tradicional, até 60 minutos após a inseminação. Os autores observaram que, mesmo na IAU, o refluxo após a inseminação é elevado ($>70\%$). No entanto, o percentual de espermatozóides no refluxo foi semelhante na IAU (22,7%) e IAT (23%). No mesmo estudo, os autores classificaram as perdas de espermatozóides no refluxo como baixas ($<20\%$) e altas ($> 20\%$), mas não observaram diferença na taxa de prenhez e tamanho da leitegada entre esses dois grupos.

As causas do refluxo do sêmen são pouco conhecidas e, muitas vezes, são devidas ao nível de habilidade e paciência do inseminador (LEVIS; BURROUGHS; WILLIAMS, 2002). Devido ao fato do sêmen ser infundido além da cérvix, o refluxo observado é baixo ou até mesmo ausente no momento da IAU, como foi constatado por Dallanora *et al.* (2005).

- Redução do número de células espermáticas por dose inseminante.

Trabalhos têm demonstrado que o número mínimo de espermatozóides utilizados por dose inseminante está diretamente relacionado ao local de deposição dos mesmos no trato genital da fêmea suína (KRUEGER e RATH, 2000; MARTINEZ *et al.*, 2002; ROCA *et al.*, 2002; VASQUEZ *et al.*, 2002). Tradicionalmente, na inseminação artificial intracervical, são utilizados de 2,5 a 4×10^9 espermatozóides por dose (STEVERINK *et al.*, 1998; RATH; KRUEGER; JOHNSON, 2000; KRUEGER e RATH, 2000; WOELDERS e MATTHIJS, 2001). No entanto, se os espermatozóides forem depositados diretamente no corno uterino ou próximo à junção útero-tubárica, este número pode ser reduzido em até 60 vezes sem que haja prejuízo para a fecundação (MARTINEZ *et al.*, 2002). Da mesma forma, o volume de sêmen utilizado por dose inseminante pode ser reduzido. Pelo fato do volume de sêmen infundido no trato genital da fêmea suína ser reduzido na inseminação artificial intra-uterina (10 a 50 ml) quando comparado à inseminação tradicional (80 a 100 ml), o tempo necessário para a inseminação se torna, conseqüentemente, menor. Da mesma forma, o tempo necessário para realizar a IAU é semelhante ou até mesmo inferior ao necessário para realizar a IAT. Flores (2001) demonstrou que eram necessários 3,6 minutos para executar a inseminação tradicional, enquanto que para a IAU esse tempo foi de 3,7 (MARTINEZ *et al.*, 2002).

- Otimização da utilização dos reprodutores.

Devido à utilização de um reduzido número de espermatozóides por dose inseminante, a inseminação intra-uterina tem um impacto direto na otimização do uso de reprodutores de alto valor genético, mantidos em grandes centros de inseminação artificial, no que se refere ao número de reprodutores e à utilização dos ejaculados, pois é possível obter um ganho de até 300% no número de doses inseminantes produzidas por reprodutor por ejaculado.

Como todas as biotécnicas, a IAU ainda apresenta limitações no seu emprego. Dentre elas, podem ser citadas:

- A dificuldade da sua utilização para fêmeas nulíparas e primíparas.

Segundo Levis; Burroughs; Williams (2002), a IAU não é recomendada para nulíparas e primíparas, possivelmente devido ao pequeno desenvolvimento do trato genital em relação às pluríparas. Tal dificuldade é encontrada, também, em algumas

fêmeas pluríparas. Segundo Martinez *et al.* (2002) e Watson e Behan (2002), em 4,6 e 9,8%, respectivamente, das fêmeas houve alguma dificuldade ou impossibilidade de introdução do cateter.

- Necessidade de uma equipe treinada para executar a técnica.

A IAU é uma técnica simples de executar, mas necessita de equipe treinada para realizá-la (Watson e Behan, 2002). Por se tratar de uma técnica com introdução de um cateter diretamente no útero, o risco de traumatismo cervical ou uterino é maior em comparação à IA tradicional.

- Necessidade de um método preciso de avaliação da concentração espermática.

Devido ao baixo número de espermatozóides utilizados por DI, qualquer variação na contagem do número de células espermáticas pode representar um valor significativo no total de espermatozóides por DI. Assim, é necessário adotar uma metodologia precisa para a contagem do número de células espermáticas.

**Experimento 1: Artificial Insemination of Gilts With 1.5 Billion Sperms Stored in
Different Periods Associated to Different Pre-Ovulatory Intervals**

**Artificial Insemination Of Gilts With 1.5 Billion Sperms Stored in
Different Periods Associated to Different Pre-Ovulatory Intervals**

Paulo Eduardo Bennemann¹, Gustavo Nogueira Diehl¹; Elisane Milbradt¹; Rosemary Machado Vidor¹; Henrique Castello Costa Fries¹; Ivo Wentz¹, Mari Lourdes Bernardi²;
Fernando Pandolfo Bortolozzo^{1a}

¹UFRGS-FAVET, Setor de Suínos, Av. Bento Gonçalves, 9090, CEP 91540-000, Porto Alegre-RS

²UFRGS-FAGRO, Depto. de Zootecnia, Av. Bento Gonçalves, 7712, 91540-000, Porto Alegre-RS.

MSc. Paulo Eduardo Bennemann

Gustavo Nogueira Diehl

Elisane Milbradt

Rosemary Machado Vidor

Henrique Castello Costa Fries

D.V.M. Ivo Wentz

D.V.M. Mari Lourdes Bernardi

D.V.M. Fernando Pandolfo Bortolozzo

^aUniversidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Veterinária

Setor de Suínos

Av. Bento Gonçalves, 9090

CEP 91540-000

Porto Alegre, RS, Brasil

Fone/Fax: 0055 051 3316 6132

e-mail: fpbortol@ufrgs.br

Abstract

This experiment evaluated the reproductive performance of gilts inseminated at three intervals before ovulation (0-12, 13-23, 24-30 h) with sperm doses (SD) stored for 0-48 and 96-120 h. A total of 218 PIC Camborough 22[®] gilts was inseminated once with SD of 1.5×10^9 sperms. Pregnant gilts (n=166) were slaughtered 30.8 ± 3.7 days after artificial insemination. The number of corpora lutea (CL) and total embryos (TE) was counted. Pregnancy rates (PR) were analyzed by Chi-square test. TE and embryonic survival (ES), obtained as the ratio between viable embryos and CL, were analyzed by GLM procedure (SAS, 1998) and means were compared by Tukey's test. Pregnancy rate was similar among artificial insemination-ovulation (AIOV) intervals when semen was stored for 0-48 h. However, the lowest PR was observed in the 24-30 h AIOV interval with storage time (ST) of 96-120 h ($P < 0.05$). There was a significant effect of the interaction between ST and AIOV ($P < 0.05$) on TE and ES variables. Total embryos and ES did not differ ($P > 0.05$) among AIOV intervals in ST of 0-48 h. However, gilts inseminated at 24-30 h AIOV interval with ST of 96-120 h showed a reduction of 6.7 embryos ($P < 0.05$) compared to gilts in the same interval inseminated with semen stored for 0-48 h. ES for the 24-30 h AIOV interval and ST of 96-120 h was lower than that observed in the other groups ($P < 0.05$).

Key words: gilts, reduced sperm dose, artificial insemination-ovulation interval, semen storage time.

1. Introduction

Real-time transcutaneous ultrasonography has allowed a noninvasive study of follicular dynamic and moment of ovulation (Weitze et al., 1989). Using ultrasonography, it has been possible to evaluate the influence of artificial insemination intervals on fertility (Soede et al., 1995, Nissen et al., 1997). The optimal fertility results occurred when artificial insemination (AI) was performed until 24 h before ovulation in sows (Soede et al., 1995, Nissen et al., 1997) and gilts (Waberski et al., 1994). In AI performed at intervals higher than 24 h before ovulation a reduction in the fertilization rate was observed (Soede et al., 1995, Kemp and Soede, 1997). Nevertheless, in another study it has been demonstrated that successful fertilization occurred in approximately 50% of gilts inseminated in an interval higher than 24 h (Soede et al., 1995). Other authors also observed that 26.7% of gilts showed embryonic survival rate higher than 78% when AI was performed at an interval higher than 24 h before ovulation (Uemoto, 1999). Probably, this phenomenon could be associated to sperm quality (Popwell and Flowers, 2004) or inherent female aspects (Rousseau and Ménézo, 1993). Studying different insemination-ovulation intervals in gilts, a group of authors observed a negative relationship between in vivo aging semen and fertilization rate (Waberski et al., 1994).

Information about the optimal insemination-ovulation interval, mainly concerning the pre-ovulatory period, and its interaction with semen storage time in vitro are scarce for gilts. The objective of this study was to evaluate the reproductive performance of gilts submitted to artificial insemination in different AIOV intervals using liquid boar semen stored up to 120 h.

2. Materials And Methods

2.1 Animals and Housing

Camborough 22[®] gilts (n = 218) were housed with 179 ± 12 d of age and 110 ± 10 kg on average. The gilts were housed in groups of eight animals per pen ($1.8 \text{ m}^2/\text{gilt}$).

2.2 Estrus Detection

Estrus detection started in the first post-housing day and was performed at 12 h intervals (07:30 and 19:30) using a mature boar. Estrus onset was defined as the first time gilt showed a standing response to back pressure in the presence of a mature boar, minus 6h. The end of estrus was defined as the last time gilt showed a standing response, plus 6h.

2.3 Time of Ovulation

Transcutaneous ultrasonography of ovaries (Weitze et al., 1989) was performed at 12 h intervals (08:00 and 20:00) beginning in the next turn after estrus onset. The presence of follicles and the determination of time of ovulation was performed with a 5 MHz sector scanner (Aloka Co., Ltd., Mure, Mitaka-shi, Tokyo 181-8622, Japan). The time of ovulation was defined as the interval between the onset of estrus and the first time when no follicles were observed, minus 6h. The ovulation was confirmed by one additional scanning 12h later.

2.4 Inseminating Doses

Semen was collected twice weekly from three mature boars (Agroceres PIC[®]). The semen was macro (color, odor, aspect and volume) and microscopically (motility, sperm concentration and morphology) evaluated. Only ejaculates that presented at least 75% spermatoc motility were processed. Spermatoc concentration (sperm/mL) was evaluated

by Neubauer Improved[®] chamber counting. A re-count of sperm number in the semen doses (SD) was performed after dilution. The same ejaculate was diluted in three different extenders, one of short-term and the other two of long-term storage, and doses of 1.5 billion sperms were produced with a total 90 mL volume. SDs were stored at 15-18°C and sperm motility was evaluated every 24 h until 120 h.

2.5 Artificial Insemination

Gilts that showed estrus, were at least 220 old and weighted more than 120 kg, were randomly selected to be inseminated once between 18 and 30 h after estrus onset in order to have different insemination-ovulation intervals. Artificial inseminations (AI) were performed with a Melrose[®] catheter and SD of 1.5×10^9 sperms in the presence of a mature boar.

2.6 Pregnancy Detection

Pregnancy detection was performed through transcutaneous ultrasonography from 21 to 23 days after AI. The gilts were slaughtered at 30.8 ± 3.7 days of pregnancy and their genital tracts were removed. The corpora lutea and embryos were counted.

2.7 Experimental design and Statistical Analyses

The semen was processed by split-sample basis originating six doses, two per extender. One SD was used between 0-48 h and the other between 96-120 h of storage time. The gilts of the first trio received only one SD stored up to 48 h (10 ± 14 h). The second trio received a SD originated of the same ejaculate, but stored from 96 up to 120 h (101 ± 8 h). Females were separated according to three insemination-ovulation (AIOV) intervals: 0-12, 13-23 or 24-30 h before ovulation. Those with AIOV interval higher than 30 h

were not included in the analysis. Pregnancy rate (PR) was analyzed by the Chi-square test. The total number of embryos (TE) and embryonic survival (ES) was analyzed using the GLM procedure (SAS,1998). In the model, the effects of extenders, semen storage time (ST), AIOV intervals, boars and of their interaction were considered. Furthermore, the number of corpora lutea was maintained as co-variable in the model used to analyze the number of embryos. The means were calculated by the LSMEANS procedure (SAS,1998) and compared by the Tukey's test.

3. Results

The duration of estrus of all gilts was 52.3 ± 13.3 h (24-84 h) and the interval between estrus onset and moment of ovulation was 33.9 ± 8.4 h (24-48), on average. The average spermatic motility was $90.2 \pm 5.6\%$ (75-95) and $81.3 \pm 5.8\%$ (75-95) in 0-48 and 96-120 h of ST, respectively.

There was no effect of extenders on PR, TE and ES ($P>0.05$). In all AIOV intervals, PR for ST of 0-48h were higher ($P<0.05$) than those for ST of 96-120 h (Table 1). When semen was stored for 0-48 h, PR was similar for all AIOVs. However, in ST of 96-120 h, the AIOV interval of 24-30 h resulted in the lowest PR ($P<0.05$).

Interaction was observed between ST and AIOV intervals ($P<0.05$) for TE and ES variables. Total embryos did not differ ($P>0.05$) among AIOV intervals when SDs were stored up to 48 h (Table 1). However, in ST of 96-120 h and AIOV interval 24-30h, a reduction of 6.7 embryos ($P<0.05$) was observed in comparison to the same interval with ST of 0-48h (Table 1). ES of the 24-30h AIOV interval and ST of 96-120h was lower ($P<0.05$) than that observed in the other groups (Table 1).

4. Discussion

In this experiment, gilts were inseminated once with a 1.5×10^9 sperm dose. The moment of ovulation was determined by transcutaneous ultrasonography. On average, ovulation took place at 64.7% of the estrus period. This data is according to Bracken et al. (2003), who observed the moment of ovulation after 60% of estrus period in gilts.

Pregnancy rates were not effected by AIOV interval when semen was stored up to 48 h. Likewise, Waberski et al. (1994) did not observe differences on fertilization rates in gilts inseminated at intervals of <12 h (82.5%), 12-24 h (79.9%) and >24 h (74.2%) before ovulation using SD stored up to 48 h. However, Uemoto (1999), working with different pre-ovulatory intervals, observed that PR on day 24 after AI was affected by AIOV interval, even with semen stored up to 40 h. In that case, the PR significantly decreased as the AIOV interval increased (100%, 89% and 73% for 0-<16, 16-<32 and >32 h, respectively).

The sperm cells aging in vitro for 96-120 h associated to semen aging in vivo in the AIOV >23 h resulted in a reduction of PR (Table 1). According to Waberski et al. (1994), the interval between insemination and ovulation has to be considered as a major factor of variation in fertility results not related to semen quality. The same authors observed that when semen was stored by 87-118 h, the fertilization rate significantly decreased with the increase in the AIOV interval. The authors observed fertilization rates of 73.0% (<12 h), 50.0% (>12 - 24 h) and 16.3% (> 24 h).

Embryonic survival at 30.8 ± 3.7 days after AI ranged from 71.9% to 78.6% in ST of 0-48 h, confirming embryonic losses of 20 to 40% until 35 days of pregnancy (Pope and First, 1985). The low number of embryos in females inseminated at 24-30 h AIOV interval with semen stored for 96-120 h (Table 1) shows the effect of both in vitro and in vivo aging of semen cells. This occurred probably due to insufficient number of

capacitated sperm cells in the oviducts. This hypothesis was suggested by Soede et al. (1995) who obtained a low number of accessory sperm cells in the embryos of sows with AIOV intervals ≥ 24 h. Waberski et al. (1994) also observed a reduction in accessory sperm cells associated to sperm aging. This fact could be an indicative of a sperm transport reduction in oviduct due to sperm cells aging. According to Steverink et al. (1997), there was an inverse relationship between AIOV interval and fertilization rate when semen was stored up to 36 h. In the present experiment, however, this relationship was not observed because the AIOV interval did not affect the PR and TE when semen was stored up to 48 h ($P > 0.05$).

It is worth noting that even when insemination was performed at 24-30 h AIOV interval and semen stored up to 48 h, 38.9% (7/18) of gilts showed an ES rate higher than 80% (Figure 1). In others studies, it has been demonstrated that when females were inseminated at > 24 h AIOV interval, some of them showed an ES rate higher than 78% (Uemoto, 1999) and fertilization rate above 90% (Soede et al., 1995, Bracken et al., 2003). This fact could be related to a longer life of sperm cells in the female genital tract. Xu et al. (1998) describe a possible division of sperm population in sub-populations that could capacitate slower or faster. Based on in vitro results, these authors suggest that a sub-population that responds slowly would have capability to fertilize the oocytes in vivo for a longer period in the female genital tract. In this way these sub-populations could be responsible for good results obtained in some females with AIOV interval higher than 23 h. In contrast, in ST of 96-120 h, other factors related to sperm cell aging could be involved. Flowers (1997) suggests that spermatozoa of dominant males could have a longer life in the female genital tract and this effect is related, in part, to the composition of seminal plasma. Popwell and Flowers (2004) showed differences among boars in the farrowing rate and litter size even when

spermatic motility and morphology were similar among them. For Harkema et al. (2004), the boar has a significant effect on the number of females with a 100% fertilization rate. However, the boar effect on the pregnancy rate and total embryos was not observed in the present study ($P>0.05$). Furthermore, according to Rousseau and Ménézo (1993), inherent female aspects could be related to a better fertilization rate. The authors suggest that some females could have better conditions for embryonic survival in their genital tract. These conditions could be associated with the composition of uterine secretion, which would be favorable to maintain sperm viability and fertilizing capacity. However, the mechanism by which some females present good results of fertilization and number of embryos, even without an optimal AIOV interval, is unclear and need more studies to be clarified.

Based on the present results, it is possible to conclude that pregnancy rate in gilts inseminated once with 1.5 billion sperms is negatively influenced by in vivo and in vitro spermatozoa aging. Embryonic survival and number of embryos are reduced by a longer in vitro semen storage (96 to 120 h) associated with a higher insemination-ovulation interval (24 to 30h).

5. References

Bracken, CJ, Safranski, TJ, Cantley, TC, Lucy, MC, Lamberson, WR, 2003: Effect of time of ovulation and sperm concentration on fertilization rate in gilts. *Theriogenology*. 60. 669-676.

Flowers, WL, 1997: Management of boars for efficient semen production. *Journal of Reproduction and Fertility*. Supplement.52. 67-78.

Harkema, W, Visser, I, Soede, NM, Kemp, B, Woelders, H, 2004: Capacity of boar spermatozoa to bind zona pellucida proteins in vitro in relation to fertilization rates in vivo. *Theriogenology*. *61*. 27-238.

Kemp, B, Soede, N M, 1997: Consequences of variation in interval from insemination to ovulation on fertilization in pigs. *Journal of Reproduction and Fertility. Control of Pig Reproduction V. Supplement 2*. 79-89.

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.

Pope, WF, First, NL, 1985: Factors affecting the survival of pig embryos. *Theriogenology*. *1*. 91-105.

Popwell, JM, Flowers, WL, 2004: Variability in relationships between semen quality and estimates of in vivo and in vitro fertility in boars. *Animal Reproduction Science*. *81*. 97-113.

Rousseau, JP, Ménézo, Y, 1993: Role of the female genital tract in the transport and survival of gametes and the fertilized egg. In: Thibault, C.; Levasseur, M. C.; Hunter, R., H., F. *Reproduction in Mammals and Man: Ellipses*. pp. 369-386.

Sas Institut (Cary, NC), 1998: *Sas user's guide: Statistical Analysis System, Release 6.12*.

Soede, N M, Wetzels, C C H, Zondag, W, Koning, M A I, Kemp, B, 1995: Effect 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.

Steverink, DWB, Soede, NM, Bouwman, 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.

Uemoto, D. A, 1999: Comportamento estral e desempenho reprodutivo de leitoas submetidas à inseminação artificial em diferentes períodos pré-ovulatórios. Master's Thesis. Post-Graduate Program in Veterinary Science. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, Brasil, 96 p.

Waberski, D, Weitze, KF, Lietmann, C, Lubbert zur Lage, W, Bortolozzo, FP, Willmen, t, Petzoldt, R, 1994: The initial fertilizing capacity of long-term stored liquid boar semen following pre- and postovulatory insemination. *Theriogenology*. *41*. 1367-1377.

Weitze, KF, Habeck, O, Willmen, R, Rath, D, 1989: Detection of ovulation in the sow using transcutaneous sonography. *Zuchthygiene*. *24*. 40-42.

Xu, X, Pommier, S, Arbov, T, Hutchings, B, Sotto, W, Foxcroft, GR, 1998: In vitro maturation and fertilization techniques for assessment of semen quality and boar fertility. *Journal of Animal Science*. *76*. 3079-3089.

Table 1: Pregnancy Rate (PR), number of corpora lutea (CL), number of total embryos (TE) and embryo survival (ES) in gilts inseminated at different insemination-ovulation (AIOV) intervals.

Storage time (h)	AIOV (h)	PR (n/n)	n	CL*	TE*	ES (%)*
	0-12	93.4 (57/61) ^a	55	17.6 ± 2.6	14.1 ± 3.2 ^a	78.6 ± 17.5 ^a
0-48	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
	0-12	78.3 (47/60) ^b	43	17.5 ± 2.6	13.2 ± 4.4 ^a	73.3 ± 23.7 ^a
96-120	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 ± Standard deviation; a, b, c in the column are different (P<0.05)

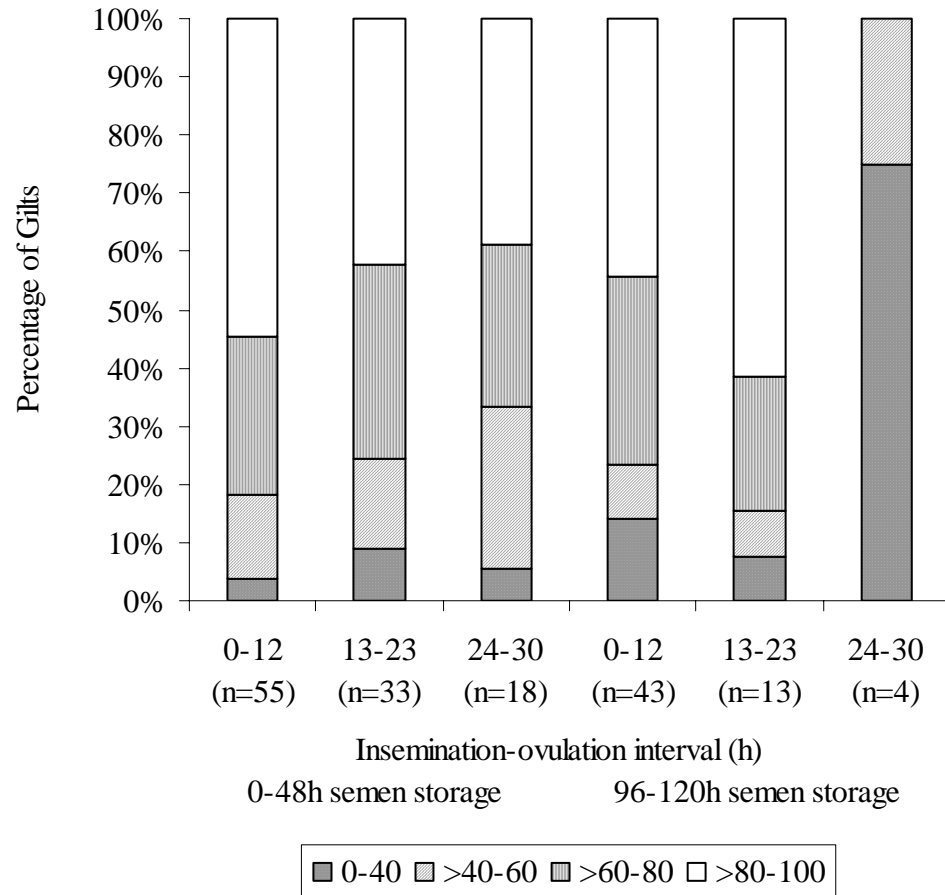


Figure 1: Embryonic survival distribution in gilts inseminated at different pre-ovulatory intervals with semen dose of 1.5 billion sperms stored up to 120 hours.

**Experimento 2: Reproductive performance of sows submitted to intrauterine
insemination at different pre-ovulatory intervals**

**Reproductive performance of sows submitted to intrauterine insemination
at different pre-ovulatory intervals**

P.E. Bennemann¹, E. Milbradt¹, G.N. Diehl¹, D. Weber¹, A.C.T. Schmidt¹, M.L.

Bernardi², I. Wentz¹, F.P. Bortolozzo^{1,3}

¹UFRGS-FAVET, Av. Bento Gonçalves, 9090, Porto Alegre, RS, Brazil.

²UFRGS-FAGRO, Av. Bento Gonçalves, 7712, Porto Alegre, -RS, Brazil.

Abstract

This study evaluated the effect of the insemination-ovulation (AIOV) interval and sperm cell dose (SD) on the reproductive performance of sows submitted to intrauterine artificial insemination (IUI). The experimental design involved a factorial 2x2 (1x10⁹ spermatozoa (1 bi) and 2x10⁹ spermatozoa (2 bi) at 0-24 and 25-36h insemination-ovulation intervals). Estrus detection and time of ovulation (assessed by transcutaneous ultrasonography) were performed twice a day at 12 h intervals. After the onset of estrus sows were distributed into the four treatments receiving a single IUI. A total of 66 PIC Camborough 22 sows were inseminated with a flexible catheter and a 60 ml SD stored at 17°C up to 36 hours. Pregnancy was determined by transcutaneous ultrasonography 20-23 days after IUI. Pregnant sows (51/57) were slaughtered at 31.7±4.3 days of pregnancy and total embryos (TE) and corpora lutea were counted. Pregnancy rate was analyzed by chi-square test. TE and embryonic survival (ES) were analyzed by GLM procedure and means were compared by Tukey's test. No interaction was observed (P>0.05) between

³ Corresponding author: fpbortol@ufrgs.br

SD and AIOV interval. PR and ES did not differ between SD or AIOV intervals ($P>0.05$). TE was not affected by SD but it was lower ($P<0.05$) for the interval insemination-ovulation of 25-36h compared to 0-24h.

Keywords: intrauterine insemination, reduced sperm number, sows, insemination-ovulation interval

Introduction

Reproductive performance of sows is affected by many factors as artificial insemination-ovulation interval (AIOV) and site of semen deposition. According to Waberski *et al.* (1994), the AIOV interval has to be considered as a major factor of variation in fertility results not related to semen quality. Studies involving real-time ultrasonography showed that the optimal interval for insemination was 0 to 24 h before ovulation in sows (Soede *et al.*, 1995), being possible to extend it to 28 h before until 4 h after ovulation without affecting farrowing rate and litter size (Nissen *et al.*, 1997).

The site of semen deposition in the female genital tract is another aspect that contributes to an optimal fertilization rate. Although Hancock (1959) had described a non-surgical technique for semen deposition into the uterus, in the 50's, only in the 90's this technique was improved (Vasquez *et al.*, 2000). The intrauterine insemination (IUI) allows a reduction of sperm cell dose and volume without a negative effect to the fertility (Martinez *et al.*, 2001). However, the optimal AIOV interval and its interaction with different sperm numbers is poorly known. The aim of this study was to verify the

reproductive performance of intrauterine inseminated sows with reduced sperm number at different intervals before ovulation.

Materials and Methods

Animals

A total of 66 PIC Camborough 22[®] sows was inseminated. Based on parity (3-9), lactation length (17-31 days), average of piglets born in life (>10 piglets), weaning-to-estrus interval (2-6 days) and visual body condition (2-5) sows were paired and assigned to one of the four treatments. After weaning the sows were housed in individual crates and received 2 kg daily of feed (3.100 Kcal DE and 14% CP) and water *ad libitum*.

Estrus detection

Estrus detection was performed at intervals of 12 h (08:30 and 20:30 h) using a mature boar. The onset of estrus was defined as the first time when the sow showed a standing response to the back pressure in the presence of the boar, minus 6 h. The end of estrus was defined as the last time when the sow showed a standing response to the back pressure test, plus 6 h.

Time of ovulation

Transcutaneous ultrasonography of ovaries (Weitze *et al.*, 1989) was performed during the estrus at 12 h intervals (08:30 and 20:30 h) beginning in the next turn after the onset of estrus. A 5 MHz sector scanner (Aloka Co., Ltd., Mure, Mitaka-shi, Tokyo 181-8622, Japan) was used to observe follicles presence and to determine the moment of ovulation. The time of ovulation was defined as the interval between the onset of

estrus and the first time when no follicles were observed, minus 6 h. The ovulation was confirmed by one additional scanning 12 h later.

Insemination doses

Semen of three mature boars Agroceres PIC[®] was collected twice weekly. The semen was macro (color, odor, aspect and volume) and microscopically (motility, spermatic concentration and morphology) evaluated. Only ejaculates that presented at least 75% of motility were utilized. Spermatic concentration (sperm/ml) was evaluated by Neubauer Improved[®] chamber counting. The sperm cells in the semen doses (SD) were recounted after dilution. SD were prepared from a single boar. Doses contained 1 or 2 billion spermatozoa extended in BTS, in a total volume of 60 ml and were stored at 15-18°C up to 36 h.

Intrauterine Insemination

Intrauterine insemination was performed between 12-24 h after estrus onset. Sows were inseminated once with 1 or 2×10^9 spermatozoa at 0-24 or 25-36 h before ovulation with a Verona (Minitub[®]) catheter model. After fixing the pipette in the cervix a catheter was slowly introduced into the uterine body and the SD was infused into one uterine horn (200 mm beyond the cervix). All IUI were performed in the presence of a mature boar.

Pregnancy detection

The pregnancy detection was performed through transcutaneous ultrasonography at 21-23 days after IUI. The sows were slaughtered at 31.7 ± 4.3 days of pregnancy and their genital tracts were removed. The corpora lutea (CL) and total embryos (TE) were counted.

Experimental design and statistical analyses

The semen was processed in a split-sample basis. Sows were separated according to AIOV intervals: 0-24 or 25-36 h before ovulation. Those with AIOV interval higher than 36 h were not included in the analysis. The variable pregnancy rate (PR) was analyzed by the Chi-square test. TE and embryonic survival (ES) were analyzed using the GLM procedure (SAS, 1998). Effects of boar, SD, AIOV intervals and of their interaction were considered in the model. Furthermore, number of corpora lutea and average of piglets born in life were included as co-variables. The means were calculated by the LSMEANS procedure (SAS, 1998) and compared by the Tukey's test.

Results

Nine sows were excluded of the analysis because their AIOV interval was higher than 36 h. The estrus length average of all the sows was 59.8 ± 16.3 h (24-120h) and average interval between estrus onset and moment of ovulation was 42.6 ± 7.7 h (24-60h). The average of SD storage at IUI moment was 13.7 ± 3.7 h (0-36h). In this study it was possible to insert the flexible catheter through the cervix into the uterus in all sows. There was no semen backflow during insemination. The blood presence on the catheter tip was observed in 1.7% (1/57) of sows.

There was no effect of the interaction between spermatozoa numbers (1 or 2×10^9 sperm) and AIOV intervals (0-24 or 25-36 h) on TE and ES ($P > 0.05$). The average of piglets born in life and the CL remained as co-variables in the model of TE and ES analysis, respectively. Boar had no effect on pregnancy rate, TE and ES ($P > 0.05$).

PR and ES were not affected neither by sperms number in the SD ($P>0.05$) nor by AIOV intervals ($P>0.05$). TE was not affected by sperms number in the SD ($P>0.05$), but it was affected ($P<0.05$) by AIOV interval (Tab.1).

Discussion

Sows were intrauterine inseminated once with 1 or 2×10^9 sperms at 0-24 or 25-36 h before ovulation. On average, ovulation occurred at 72% of the estrus period which is similar to the range of 68-72% reported previously for sows (Soede *et al.*, 1995; Nissen *et al.*, 1997; Steverink *et al.*, 1997).

In this study it was possible to insert the flexible catheter through the cervix in all sows, corroborating with results of other studies in which 94.0 and 97.4% of success was achieved with this method (Roca *et al.*, 2003 and Dallanora *et al.*, 2003a, respectively). The presence of blood in the catheter tip was observed in 1.7% of sows. Similar results (1.7%) were observed by Watson and Behan (2002).

Semen backflow during insemination did not occur what is consistent with other studies in which females were intrauterine inseminated with semen doses of 60 or 20 ml (Dallanora *et al.*, 2003b). In females inseminated traditionally with 80 ml doses, Steverink *et al.* (1998) observed that more than 5% of the inseminated spermatozoa in backflow during insemination affected fertilization negatively in those sows inseminated with 1 billion spermatozoa compared to those receiving 3 or 6 billion doses. However, backflow after insemination had no effect on fertilization results. Recently, it has been observed, that even with intrauterine deposition, backflow semen after insemination is possible (Dallanora *et al.*, 2003b). These authors reported that average volume of backflow ranged from 64% to 75% in females inseminated with 0.25

to 1 billion spermatozoa in 20 ml or 1.5 billion in 60 ml. The average percentage of spermatozoa in the backflow after insemination ranged from 12% for doses of 0.25, 0.5 or 1 billion spermatozoa in 20 ml to 23% for 1.5 billion in 60 ml. A combination of low dosage and loss of spermatozoa due to backflow during insemination, may lead to sub-optimal fertilization results (Steverink *et al.*, 1998). Steverink *et al.* (1998) observed that the concentration of spermatozoa in backflow during traditional insemination is higher if compared to the backflow after insemination. Therefore, one of the advantages of intrauterine insemination would be the absence of backflow during insemination. The deposition of semen directly into the uterus associated to a low volume could result in a better and faster sperm distribution in the female genital tract and consequently avoiding semen backflow during insemination.

Although some authors describe a positive effect of higher sperm number on the fertilization rate (Baker *et al.*, 1968; Lefebvre and Suarez, 1996; Flowers, 2003), in the present study, PR did not differ between 1 and 2×10^9 spermatozoa. In other studies using IUI it was not observed a detrimental effect on PR, litter size and total embryos with 1.5 billion (Dallanora *et al.*, 2003a), 1 billion (Watson and Behan, 2002) or 0.5 to 1 billion (Mezalira *et al.*, 2004) spermatozoa. Probably, in IUI, the sperm transport until the utero-tubal junction would be more efficient, allowing optimal fertility rates, even with a reduced sperm number. It has been suggested that deep intrauterine insemination produces a large distension of the cervix and uterine horn, which might induce a greater release of hormones implicated in uterine contractility and sperm transport compared with the traditional insemination method (Martinez *et al.*, 2002). According to Watson and Behan (2002) the site of sperm deposition affects fertility results. The authors observed that 1 billion doses resulted in PR and litter size

higher in IUI (88.7% and 12.1, respectively) than in traditional artificial insemination (66.2% and 10.3, respectively).

The TE was similar to 1 and 2×10^9 spermatozoa. In other studies, TE or litter size were similar between 0.5 and 1.0 (Mezalira *et al.*, 2004) or between 1.0 and 3.0 billion spermatozoa (Watson and Behan, 2002). In the same way, Dallanora *et al.* (2003a), performing IUI with 1.5 billion dose, did not observe differences in the litter size when compared to control group (traditional artificial insemination with 3 billion dose).

It has been demonstrated that in the traditional artificial insemination with 3×10^9 spermatozoa, the optimal AIOV interval is up to 24 h (Soede *et al.*, 1995; Kemp and Soede, 1997; Steverink *et al.*, 1997). However, in IUI, the optimal AIOV interval still remains unclear. In most of the experiments, the intrauterine insemination was performed in an AIOV interval of 0-24 h achieved by hormonal treatment (Kruger *et al.*, 1999; Martinez *et al.*, 2002), ultrasound monitoring of time of ovulation (Wolken *et al.*, 2002) or multiple inseminations during estrus (Watson and Behan, 2002). In the present study, with 1 and 2 billion spermatozoa, PR was not affected by the AIOV interval up to 36h. This could be explained by the fact that semen deposition beyond the cervix could reduce sperm losses by backflow during insemination, proportioning a higher sperm number in the utero-tubal junction. However, the insemination at 25-36h before ovulation resulted in a reduction of 2 embryos per AI ($P < 0.05$). This could be due to a possible *in vivo* aging of spermatozoa at the moment of fertilization. Spermatozoa aging could lead to mitochondrial DNA damage or chromosomal abnormalities, and even if the sperm cell still preserves its capacity to penetrate the oocyte, this damage would compromise the viability of the conceptus (Vishwanath and Shannon, 1997). Nevertheless, to confirm the optimal AIOV interval in IUI, it would be necessary to

perform more studies with a higher number of females inseminated with lower sperm cell doses.

ES average was 64.7 and 69.8% in sows inseminated with 1 and 2×10^9 spermatozoa, respectively, which is in agreement to losses up to 40% until 35 days of pregnancy reported previously (Pope and First, 1985). Surprisingly, even when insemination was performed at an AIOV interval of 25-36h, 15.8% of sows showed an ES rate higher than 80%. Other authors also obtained a ES rate higher than 78% (Bortolozzo *et al.*, 2000) or fertilization rate above 90% (Soede *et al.*, 1995; Bracken *et al.*, 2003) when the insemination was performed at an AIOV higher than 24 h. This fact could be related to longer spermatoc viability in the female genital tract. Nevertheless, the mechanism by which some sows present good fertility results at AIOV intervals higher than 24 h is still unknown. Xu *et al.* (1998) described a possible division of sperm populations in sub-populations which could lead to slower or faster capacitation. Based on *in vitro* results, these authors suggest that a sub-population that respond slowly would maintain the capability to fertilize oocytes *in vivo* for a longer period. In this way, these sub-populations could be responsible for the optimal results obtained in some females with AIOV interval higher than 24 h. Other authors comment the existence of boars that present a longer sperm lifetime in the female genital tract and this effect could be related to plasma seminal composition (Flowers, 1997). Furthermore, according to Rousseau and Ménézo (1993), inherent female aspects could be related to a better fertilization rate in some of them. The authors suggest that some females could have better conditions to embryonic survival in their genital tract and this could be associated to the uterine secretion and composition, which would benefit viability or sperm fertilizing ability.

Conclusion

In sows intrauterine inseminated with semen stored up to 36 h, pregnancy rate, number of total embryos and embryo survival are not affected by sperm cell dose when the artificial insemination-ovulation interval is up to 24 h. However, when this interval is between 25-36 h, the number of total embryos is reduced.

References

- Baker RD, Dziuk PJ, Norton HW.** 1968. Effect of volume of semen, number of sperm and drugs on transport of sperm in artificially inseminated gilts. *J Anim Sci*, 27:88-93.
- Bortolozzo FP, Uemoto DA, Wentz I, Pozzobon MC.** 2000. Reproductive performance of gilts submitted to artificial insemination in different intervals before ovulation. *In: 4th. International Conference on Boar Semen Preservation, 2000, Beltsville. Abstract book.* Beltsville, USA, Allen Press, p.239 (abstract).
- Bracken CJ, Safranski TJ, Cantley TC, Lucy MC, Lamberson WR.** 2003. Effect of time of ovulation and sperm concentration on fertilization rate in gilts. *Theriogenology*, 60:669-676.
- Dallanora D, Mezalira A, Katzer LH, Bernardi ML, Bortolozzo FP, Wentz I.** 2003a. Intrauterine insemination with reduced sperm number on a commercial pig farm. *In: International Conference on Boar Semen Preservation, 5, 2003, Doorwerth, The Netherlands. Abstracts.* IV-P50.
- Dallanora D, Mezalira A, Katzer LH, Schmidt, ACT, Bernardi ML, Bortolozzo FP, Wentz I.** 2003b Volume e número de espermatozóides no refluxo de fêmeas suínas

após inseminação intra-uterina. *In: Congresso da Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos*, 11, 2003, Goiânia-GO, *Abstracts*. Goiânia, 2003, p.215-216.

Flowers WL. 1997. Management of boars for efficient semen production. *J Reprod Fertil Suppl*, 52:67-78.

Flowers WL. 2003. Future reproductive technologies:-applied results of trans cervicral insemination and other studies related to artificial insemination. *In: 47th Annual North Carolina Pork Conference*, 2003, North Carolina, USA. Available in: <http://mark.asci.ncsu.edu/NC Pork Conf/2003/flowers.htm>. Accessed in: July 2^{sd} 2004.

Hancock JL. 1959. Pig insemination technique. *Vet Rec*, 71:527.

Kemp B, Soede NM. 1997. Consequences of variation in interval from insemination to ovulation on fertilization in pigs. *J Reprod Fertil Suppl*, 52:79-89.

Krueger C, Rath D, Johnson LA. 1999. Low dose insemination in synchronized gilts. *Theriogenology*, 52:1363-1373.

Lefebvre R, Suarez SS. 1996. Effect of capacitation on Bull sperm binding to homologous oviductal epithelium. *Biol Reprod*, 54:575-582.

Martinez EA, Vasquez JM, Roca J, Lucas X, Gil MA, Vazquez L. 2001. Deep intrauterine insemination and embryo transfer in pigs. *J Reprod Fertil Suppl*, 58:301-311.

Martinez EA, Vazquez JM, Roca J, Lucas X, Gil MA, Parrilla I, Vazquez JL, Day BN. 2002. Minimum number of spermatozoa required for normal fertility after deep intrauterine insemination in non-sedated sows. *Reproduction*, 123:163-170.

Mezalira A, Dallanora D, Bernardi ML, Wentz I, Bortolozzo FP. 2004. Reproductive performance of sows submitted to intrauterine insemination with different sperm cell dose. *In: International Pig Veterinary Congress*, 18, 2004, Hamburg-Germany, *Proceedings*, v. 2, p. 477.

Nissen AK, Soede NM, 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.

Pope WF, First NL. 1985. Factors affecting the survival of pig embryos. *Theriogenology*. 23: 91-105.

Roca J, Carvajal G, Lucas X, Vazquez JM, Martinez EA. 2003. Fertility of weaned sows after deep intrauterine insemination with a reduced number of frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology*, 60:77-87.

Rousseau JP, Ménézo Y. 1993. Role of the female genital tract in the transport and survival of gametes and the fertilized egg. *In*: Thibault C, Levasseur MC, Hunter RHF. Reproduction in mammals and man. Ed. Edition Marketing. Paris. p.369-386.

SAS user's guide: statistical analysis system. 1998. Release 6.12. SAS Institut, Cary, NC, USA.

Soede NM, Wetzels CCH, Zondag W, Koning MAI, Kemp B. 1995. Effect of time of insemination relative to ovulation, as determined by ultrasonography, on fertilization rate and accessory sperm count in sows. *J Reprod Fertil*, 104:99-106.

Steverink DWB, Soede NM, Bouwman EG, Kemp B. 1997. Influence of insemination-ovulation interval and sperm cell dose on fertilization in sows. *J Reprod Fertil*, 111:165-171.

Steverink DWB, Soede NM, Bouwman EG, Kemp B. 1998. Semen backflow after insemination and its effect on fertilization results in sows. *Anim Reprod Sci*, 54:109–119.

Vazquez JL, Martinez EA, Vazquez JM, Lucas MA, Gil IP, Roca J. 2000. Development of a non-surgical deep intra-uterine insemination technique. *In*: 4th. International Conference on Boar Semen Preservation, 2000, Beltsville. *Abstract book*. Beltsville, USA, Allen Press, p.262-263.

- Vishwanath R, Shannon P.** 1997. Do sperm cells age? A review of the physiological changes in sperm during storage at ambient temperature. *Reprod Fertil Dev*, 9:321-331.
- Waberski D, Weitze KF, Lietmann C, Lubbert Zur Lage W, Bortolozzo FP, Willmen T, Petzoldt R.** 1994. The initial fertilizing capacity of longterm-stored liquid boar semen following pre- and postovulatory insemination. *Theriogenology*, 41:1367-1377.
- Watson PF, Behan JR.** 2002. Intrauterine Insemination of sows with reduced sperm numbers: results of a commercially based field trial. *Theriogenology*, 57:1683-1693.
- Weitze KF, Habeck O, Willmen R, Rath D.** 1989. Detection of ovulation in the sow using transcutaneous sonography. *Zuchthygiene*, 24:40-42.
- Wolken A, Rath D, Bortolozzo FP, Wentz I, Marquetti AN.** 2002. A. Sows can successfully be inseminated non-surgically into the distal uterine horn with a highly reduced number of sperm cells. *Theriogenology*, 57:392. (abstract).
- Xu X, Pommier S, Arbov T, Hutchings B, Sotto W, Foxcroft GR.** 1998. *In vitro* maturation and fertilization techniques for assessment of semen quality and boar fertility. *J Anim Sci*, 76: 079-3089.

Table 1- Pregnancy Rate (PR), Corpora Lutea (CL), Total Embryos (TE) and Embryo survival (ES) in sows submitted to one intrauterine insemination with 1 or 2×10^9 spermatozoa at 0-24 or 25-36 h before ovulation.

		PR% (n/n)	n	CL*	TE*	ES (%)*
Dose ($\times 10^9$)	1	82.1 (23/28)	21	20.6 ± 2.9	15.9 ± 2.4	69.8 ± 12.0
	2	96.5 (28/29)	27	22.3 ± 4.4	14.9 ± 4.2	64.7 ± 19.6
Interval (h)	0-24	88.2 (30/34)	29	21.3 ± 2.8	16.4 ± 3.3^a	70.3 ± 13.6
	25-36	91.3 (21/23)	19	22.0 ± 5.2	14.4 ± 3.6^b	64.2 ± 21.2

*Adjusted means \pm Standard deviation; a, b in the column differ ($P < 0.05$).

**Experimento 3: Desempenho Reprodutivo de Fêmeas Suínas Submetidas à
Inseminação Artificial Intra-uterina ou Tradicional**

Artigo submetido ao corpo editorial do periódico Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.

Artigo formatado segundo normas do periódico.

Desempenho Reprodutivo de Fêmeas Suínas Submetidas à Inseminação Artificial Intra-uterina ou Tradicional

Reproductive Performance of Sows Submitted to Intrauterine or Tradicional Artificial Insemination

P.E. Bennemann¹, F.L. Koller¹, M.L. Bernardi², I. Wentz¹, F.P. Bortolozzo^{1,3}

¹ UFRGS-FAVET, Setor Suínos, Bento Gonçalves, 9090, CEP 91540-000, Porto Alegre-RS

² UFRGS-FAGRO, Depto. Zootecnia, Bento Gonçalves, 7712, 91540-000, Porto Alegre-RS.

RESUMO

Foram utilizadas 298 pluríparas Camborough 22[®] distribuídas em dois tratamentos: T1 (n=154), inseminação intra-uterina (IAU) com dose inseminante (DI) contendo 0,5 bilhão de espermatozóides em volume total de 20 ml; T2 (n=144), inseminação tradicional (IAT) com DI contendo 3,0 bilhões de espermatozóides em volume total de 90 ml. Foi possível a realização da IAU em 98,1% das fêmeas. A presença de sangue, na extremidade do cateter ou espiral da pipeta de IAU, foi observada em 8,4 % das fêmeas. As taxas de prenhez (TPr) e de parto ajustada não diferiram ($P>0,05$) entre a IAU e IAT. O tamanho da leitegada (TL) diferiu entre os tratamentos ($P<0,05$), sendo observada redução de 0,8 leitão na IAU. A presença de sangue na IAU, não afetou a TPr ($P>0,05$), mas reduziu o TL em 2,6 leitões ($P<0,05$).

ABSTRACT

A total of 298 Camborough 22[®] sows was distributed in two treatments: T1 (n=154): intrauterine insemination (IUI) with 0.5 billion sperms in 20 ml total volume; T2 (n=144): traditional insemination (TAI) with 3.0 billion sperms in 90 ml total volume. It was possible to perform the IUI in 98.1% of sows. It was observed presence of blood on the catheter tip or pipete in 8.4 % of IUI sows. The pregnancy (PR) and adjusted

³ Autor para correspondência: fpbortol@ufrgs.br

farrowing rates did not differ ($P>0.05$) among treatments. Litter size (LS) differ among treatments ($P<0.05$), being observed a reduction of 0.8 piglet in IUI. The blood presence in the IUI did not affect the PR ($P>0.05$), but resulted in a reduction of 2.6 piglets per litter ($P<0.05$).

INTRODUÇÃO

Durante a década de 60, fêmeas suínas foram inseminadas com diferentes volumes e número de espermatozóides e foi observado que eram necessários, no mínimo, 5×10^9 espermatozóides em 100 ml para alcançar bons índices de fecundação (Baker *et al.*, 1968). Embora Hancock (1959) e Hancock e Hovell (1961) tenham demonstrado que a fertilidade varia de acordo com o local de deposição do sêmen, o volume e o número de espermatozóides por dose inseminante (DI) foram pouco alterados nos últimos 40 anos. Atualmente, na inseminação artificial tradicional (IAT), são utilizadas de 2 a 3 doses inseminantes (DIs) por estro, cada uma delas contendo de 2 a 4 bilhões de espermatozóides, diluídos em 80 a 100 ml de volume, totalizando até 12 bilhões de espermatozóides por fêmea inseminada (Rath *et al.*, 2000; Martinez *et al.*, 2001).

Nos últimos cinco anos, vários estudos têm confirmado que o número de espermatozóides, bem como o volume da DI podem ser reduzidos, sem prejuízo à fertilidade, se a deposição do sêmen for realizada além da cérvix (Martinez *et al.*, 2001; Wolken *et al.*, 2002; Watson & Behan, 2002). Recentemente, foi demonstrado que, com a inseminação intra-uterina (IAU), é possível a utilização de 500 milhões de espermatozóides sem prejuízo à taxa de prenhez e número de embriões totais (Mezalira *et al.*, 2004). No entanto, taxa de parto e número de leitões nascidos com a utilização de 500 milhões de espermatozóides por DI, ainda, são pouco estudados.

O objetivo deste estudo foi avaliar o desempenho reprodutivo de fêmeas suínas submetidas à técnica de IAU com 0,5 bilhão de espermatozóides em comparação à IAT com 3 bilhões de espermatozóides.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 298 pluríparas Camborough 22[®] do plantel reprodutivo de uma granja produtora de leitões. As matrizes foram separadas de acordo com a ordem de parto (1-8), média do tamanho da leitegada dos partos anteriores (7-10, >10-12, >12),

intervalo desmame-estro (2-9), dias de lactação (12-22) e escore corporal visual (2-5), para serem distribuídas em dois tratamentos. O tratamento 1 (n=154) consistiu de inseminações pela técnica de IAU com doses contendo 0,5 bilhão de espermatozóides em volume total de 20 ml. No tratamento 2 (n=144) foi efetuada a IAT com doses contendo 3,0 bilhões de espermatozóides em volume total de 90 ml.

Após o desmame, as matrizes foram alojadas em gaiolas individuais dotadas de um cocho acessório. O arraçoamento foi realizado à vontade, com ração lactação (3.300 Kcal EM/kg), até o início do estro. As matrizes que demonstraram sinais de estro foram deslocadas para a linha de cobertura, sendo arraçadas com ração gestação (2.950 Kcal EM/kg). Após a inseminação, as matrizes foram mantidas em regime de restrição alimentar (1,8 kg/dia), durante 5 dias.

O diagnóstico de estro foi realizado duas vezes ao dia (07:30 e às 15:30 horas) com auxílio de um macho sexualmente maduro. Foram utilizadas somente as fêmeas que manifestaram estro no turno da manhã. Para o cálculo do início do estro dessas fêmeas foi considerado o momento em que a fêmea apresentou reflexo de imobilidade à pressão lombar exercida por um funcionário, na presença do macho, menos 8 horas. O final do estro foi definido como o momento em que a fêmea não apresentou mais o reflexo de imobilidade à pressão lombar, menos 4 (quando à tarde) ou 8 horas (quando pela manhã).

A determinação do momento da ovulação, por ultra-sonografia transcutânea, com auxílio de um transdutor setorial de 5 MHz (Aloka Co., Ltd., Mure, Mitaka-shi, Tokyo 181-8622, Japan), foi realizada a cada 12 horas (07:00 e às 19:00), a partir do turno seguinte a manifestação do estro. O momento da ovulação foi definido como o primeiro exame ultra-sonográfico sem a presença de folículos pré-ovulatórios, menos 6 horas. A ovulação foi confirmada por um exame adicional, 12 horas mais tarde.

Como doadores de sêmen, foram utilizados 10 machos adultos Agrocetes PIC[®] mantidos em regime de duas coletas semanais. O ejaculado foi submetido a exame macro (cor, odor, aspecto e volume) e microscópico (motilidade, concentração, aglutinação e morfologia espermática). Foram processados somente ejaculados que apresentaram no mínimo 75% de motilidade. A determinação da concentração espermática (espermatozóides/ml) foi realizada por contagem em câmara de Neubauer Improved[®]. Após a diluição, foi realizada nova contagem do número de espermatozóides contidos na DI. As DIs foram preparadas a partir da mistura de dois

ejaculados por “Split-sample”. Foram confeccionadas doses inseminantes com 3,0 e 0,5 bilhões de espermatozoides totais, diluídos em BTS, em volume total de 90 e 20 ml, respectivamente. As doses foram armazenadas a 15-18°C por, no máximo, 30 horas.

A IAT foi realizada com pipeta de Melrose. Para a IAU foi utilizada uma pipeta de IA descartável Supertip[®] com cateter modelo Verona[®] (Minitub). Após fixar a pipeta na cérvix, o cateter foi introduzido lentamente no lúmen uterino (cerca de 200 mm), permitindo, desta forma, a deposição das células espermáticas além da cérvix, no ambiente uterino. As matrizes foram inseminadas apenas uma vez ao dia, sendo a primeira inseminação efetuada no turno seguinte à manifestação do estro e as seguintes com intervalos de 24 horas, enquanto a fêmea esteve em estro. No momento da inseminação, foi registrada a presença ou ausência de refluxo de sêmen. Após a IAU, foi realizada a inspeção da pipeta e do cateter, e 120 minutos após, do vestibulo e vagina, quanto à presença ou ausência de sangue.

O controle de retorno ao estro foi iniciado a partir do 18º dia após a IA e, ao 23º dia, foi realizado o diagnóstico de gestação por ultra-sonografia transcutânea em tempo real. Ao parto, foram coletados os dados do tamanho da leitegada (TL).

O delineamento experimental foi completamente casualizado. As variáveis taxa de prenhez (TP_r) e taxa de parto ajustada (excluindo as fêmeas mortas e descartadas por problemas não reprodutivos) (TPA) foram analisadas pelo teste de Qui-quadrado. O TL foi analisado pelo procedimento GLM, sendo as médias calculadas pelo procedimento LSMEANS e comparadas pelo teste t (SAS, 1998). Além do efeito do tratamento, foram testadas no modelo as covariáveis ordem de parto, intervalo desmame-estro, duração da lactação, escore corporal visual e média do tamanho da leitegada dos partos anteriores. Apenas a média do tamanho da leitegada dos partos anteriores apresentou efeito significativo e foi mantida no modelo como covariável para TL.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A duração média do estro foi de $70,3 \pm 17,8$ horas (24 a 144 horas) e o intervalo médio entre início do estro e a ovulação foi de $42,1 \pm 11,0$ horas (18 a 90 horas). A passagem do cateter através do canal cervical e realização da IAU foi possível em 98,1% das fêmeas (151/154). Em outros trabalhos, nos quais a IAU foi realizada com cateteres semelhantes ao utilizado nesse estudo, o sucesso na passagem pela cervix foi superior a 95% (Watson & Behan, 2002; Dallanora *et al.*, 2005). Segundo Martinez *et*

al. (2002), a ordem de parto (2 a 6) das fêmeas não teve influência no grau de dificuldade e no tempo dispendido para realizar a IAU. Dessa forma, é possível que características anatômicas, específicas de cada fêmea, sejam responsáveis pelo grau de dificuldade de passagem do cateter pelo canal cervical.

Não foi observado refluxo de sêmen durante a IAU, o que está de acordo com os dados de Dallanora *et al.* (2005) e Bennemann *et al.* (2004), os quais utilizaram DIIs com volumes de 60 ml. No presente estudo, foram infundidos somente 20 ml o que, certamente, evitou ainda mais o refluxo durante a IAU. É possível que a deposição de menor volume de sêmen no amplo ambiente uterino permita a rápida distribuição do sêmen no trato genital da fêmea e, como consequência, a não ocorrência de refluxo. Outra hipótese, para explicar a ausência de refluxo de sêmen no momento da inseminação, é que com a técnica de IAU há grande distensão da cérvix e do corno uterino pela presença do cateter, induzindo a uma maior liberação de hormônios envolvidos na contratilidade uterina, tornando o transporte espermático mais eficiente (Martinez *et al.*, 2002). Nas fêmeas inseminadas pela IAT, foi observado refluxo em 10,4 % delas. De acordo com Steverink *et al.* (1998), o refluxo de sêmen na IAT pode ser considerado um processo fisiológico normal, uma vez que é observado na maioria das fêmeas, afetando ou não o desempenho reprodutivo, dependendo do volume refluído.

Foi observada presença de sangue na extremidade do cateter ou espiral da pipeta, na IAU, em 8,4% (13/154) das fêmeas. Em trabalho recente, Dallanora *et al.* (2005) observaram a presença de sangue em 9,5% das fêmeas. Por outro lado, Watson & Behan (2002) observaram sangue em somente 1,8% das fêmeas. No trabalho de Dallanora *et al.* (2005), foi avaliada a presença de sangue não só no cateter, mas também no refluxo de sêmen coletado em bolsas de colostomia, até 120 minutos após a IA. Assim, pequenas lesões ocorridas no trato genital da fêmea, que não levariam à presença de sangue no momento da retirada do cateter, poderiam resultar em sangue no refluxo, elevando dessa forma o percentual de fêmeas com a presença de sangue na IAU. No presente trabalho, foi realizada inspeção do vestíbulo vaginal à procura de evidências de sangue, 120 minutos após a IAU. Esses aspectos provavelmente explicam o maior percentual de fêmeas com sangramento, no presente estudo e naquele de Dallanora *et al.* (2005), em comparação ao de Watson & Behan (2002). É possível que determinadas fêmeas possam apresentar lesões pré-existentes no trato reprodutivo que predisporiam a

traumatismos, principalmente em casos onde foi encontrada maior resistência ao avanço do cateter e maior pressão foi imposta para introduzi-lo além da cérvix (Watson & Behan, 2002). Para diminuir as possibilidades de traumatismo, o cateter deve ser inserido somente enquanto puder ser manipulado suavemente, não devendo ser forçado.

Não foram observadas diferenças ($P>0,05$) na TPr e TPA entre IAU e IAT (Tab. 1), evidenciando que a IAU com 0,5 bilhão de espermatozóides foi eficiente na formação de um reservatório espermático adequado na junção útero-tubárica, capaz de levar a índices de prenhez superiores a 95%. Watson & Behan (2002) também não observaram diferenças nas taxas de prenhez e de parto quando compararam a IAU com 1,0 bilhão de espermatozóides e IAT com 2,0 bilhões de espermatozóides. Dallanora *et al.* (2005) não observaram diferenças na TPr e TPA entre IAU e IAT com DIIs de 1,5 e 3,0 bilhões de espermatozóides, respectivamente. Mezalira *et al.* (2004), trabalhando com fêmeas inseminadas uma única vez por IAU, abatidas aos 34 a 41 dias de gestação, não observaram diferença na TPr e número de embriões entre 1,0 (84,7% e 13,3) e 0,5 (85,5% e 14,3) bilhão de espermatozóides. No entanto, a TPr foi reduzida quando o número de espermatozóides baixou de 0,5 bilhão (85,5%) para 0,25 bilhão (77,1%). Wolken *et al.* (2002) observaram redução da TPr quando foram utilizadas DIIs de 20 ml com 0,1 bilhão (65,2%) de espermatozóides em comparação a 0,5 bilhão (77,3%). Esses trabalhos mostram que, na IAU, doses com menos de 0,5 bilhão de espermatozóides podem comprometer a taxa de prenhez.

A presença de sangue na pipeta de IAU não afetou ($P>0,05$) a TPr (Tab. 2), discordando de Dallanora *et al.* (2005), os quais observaram taxa de retorno ao estro superior nas fêmeas com sangramento (13,8%), em comparação à das fêmeas sem sangramento (2,6%). Embora todas as fêmeas nas quais foi observado sangramento tenham ficado prenhes e parido, a presença de sangue afetou o TL ($P<0,05$). As fêmeas da IAU, nas quais o sangue estava presente, apresentaram redução de 2,6 leitões no TL (Tab. 2), o que contribuiu para a redução da média geral das fêmeas submetidas à IAU (Tab. 1). O efeito tóxico do sangue sobre a célula espermática poderia ter sido responsável por uma diminuição da população espermática no ambiente uterino, resultando em menor número de espermatozóides na junção útero-tubárica, que não estariam aptos a fecundar todos os oócitos liberados, explicando o TL reduzido na IAU em comparação a IAT. Este dado salienta a importância que deve ser atribuída ao treinamento do pessoal que executa a técnica de IAU. Apesar de Watson & Behan

(2002) comentarem que a IAU se trata de uma técnica simples e, que com um mínimo de treinamento os funcionários da granja podem executá-la, é importante salientar que problemas operacionais poderão comprometer o seu sucesso. No entanto, dados relativos à presença de sangue na IAU e o seu efeito sobre a taxa de prenhez e o número de leitões nascidos ainda são escassos, necessitando de mais avaliações.

O TL diferiu entre os tratamentos ($P < 0,05$), sendo observada redução de 0,8 leitão nas fêmeas da IAU em comparação a IAT (Tab. 1). Em outros trabalhos, não foram observadas diferenças no TL, quando a IAU foi efetuada com 1,0 (Watson & Behan, 2002) ou 1,5 (Dallanora *et al.*, 2005) bilhão de espermatozóides em comparação à inseminação tradicional com 3,0 bilhões. Mezalira *et al.* (2004) utilizaram a inseminação intra-uterina com 0,25, 0,5 e 1,0 bilhão de espermatozóides e observaram redução do número de embriões totais somente quando foram utilizados 0,25 bilhão de espermatozóides. A redução do número de espermatozóides por dose na IAU poderia reduzir os índices de fertilidade, caso houvesse problema em alguns dos machos (Mezalira *et al.*, 2004). No entanto, no presente estudo, foi utilizado um “pool” de sêmen, minimizando um possível efeito negativo dos machos. Dessa forma, outros fatores como intervalo inseminação-ovulação e viabilidade espermática poderiam estar envolvidos na redução do TL. Wolken *et al.* (2002) e Mezalira *et al.* (2004) inseminaram fêmeas com intervalo inseminação-ovulação de até 24 horas e observaram redução no número de embriões quando foram infundidos menos de 0,5 bilhão de espermatozóides. No presente estudo as inseminações foram efetuadas a cada 24 horas, sendo possível que esse intervalo seja crítico quando se trata de doses com 0,5 bilhão de espermatozóides ou menos, em termos de manutenção de uma população espermática compatível com altas taxas de fecundação. No entanto, esse aspecto necessita de mais estudos para esclarece-lo.

Embora poucos trabalhos tenham sido realizados, em condições práticas de granja, para validar os resultados obtidos com a técnica de deposição intra-uterina do sêmen, os resultados do presente estudo mostram que o número mínimo de espermatozóides para a obtenção de índices semelhantes aos obtidos na inseminação tradicional, deve ser superior a 0,5 bilhão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAKER, R.D., DZIUK, P.J., NORTON, H. W. Effect of volume of semen, number of sperm and drugs on transport of sperm in artificially inseminated gilts. *Journal of Animal Science*, v.27, p.88-93, 1968.
- BENNEMANN, P.E., MILBRADT, E., DIEHL, G.N. *et al.* Reproductive performance of sows submitted to intrauterine insemination in different pre-ovulatory intervals. *Animal Reproduction*. v. 1, p. 106-110, 2004.
- DALLANORA, D., MEZALIRA, A., KATZER L.H. *et al.* Desempenho reprodutivo de fêmeas suínas inseminadas pela técnica intra-uterina ou tradicional. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 39, n. 8, p. 815-819, 2005.
- HANCOCK, J.L. Pig insemination technique. *Veterinary Record*, v.71, p.527, 1959.
- HANCOCK, J.L., HOVELL, J.R. The effect of semen volume and number of spermatozoa on the fertility of intra-uterine inseminations of pigs. *Animal Production*, v.3, p.153-160, 1961.
- MARTINEZ, E.A., VASQUEZ, J.M., ROCA, J. *et al.* Deep intrauterine insemination and embryo transfer in pigs. *Journal of Reproduction and Fertility*, Supplement 58: Control of Pig Reproduction VI, p. 301-311, 2001.
- MARTINEZ, E.A., VAZQUEZ, J.M., ROCA, J. *et al.* Minimum number of spermatozoa required for normal fertility after deep intrauterine insemination in non-sedated sows. *Reproduction*, v.123, p.163-170, 2002.
- MEZALIRA, A., DALLANORA, D., BERNARDI, M.L. *et al.* Influence of sperm cell dose and post-insemination backflow on reproductive performance of intrauterine inseminated sows. *Reproduction in Domestic Animals*. 2004. *In Press*.

RATH, D., KRUEGER, C., JOHNSON, L.A. Low dose insemination technique in the pig. In: BOAR SEMEN PRESERVATION CONGRESS, 4., 2000, Beltsville. *Proceedings...* Beltsville, USA, 2000, p. 115-118.

SAS INSTITUTE INC. SAS user's guide: Statistical Analysis System, Release 6.12. Cary, NC, 1998.

STEVERINK, D.W., SOEDE, N.M., BOUWMANN, E.G. *et al.* Semen backflow after insemination and its effect on fertilization results in sows. *Animal Reproduction Science*, v.54, p.109-119. 1998.

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

WOLKEN, A., RATH, D., BORTOLOZZO, F. *et al.* Sows can successfully be inseminated non-surgically into the distal uterine horn with a highly reduced number of sperm cells. *Theriogenology*, v. 57, n. 1, p. 392, 2002.

Tabela 1: Taxa de prenhez (TPr), taxa de parto ajustada (TPA) e tamanho da leitegada (TL) de fêmeas inseminadas pela técnica intra-uterina (IAU) ou tradicional (IAT).

Tratamento	TPr (n/n)	TPA (n/n)	TL
IAU ($0,5 \times 10^9$)	95,4 (147/154)	92,7 (140/151)	$11,3 \pm 3,4^a$
IAT ($3,0 \times 10^9$)	97,9 (141/144)	95,1 (136/143)	$12,1 \pm 3,4^b$

a, b na coluna indicam médias diferentes ($P < 0,05$)

Tabela 2: Taxa de prenhez (TPr), taxa de parto ajustada (TPA) e tamanho da leitegada (TL) de fêmeas com presença ou ausência de sangue na inseminação intra-uterina.

Presença de Sangue	TPr (n/n)	TPA (n/n)	TL
Não	95,0 (134/141)	92,0 (127/138)	11,6 ± 3,4 ^a
Sim	100,0 (13/13)	100,0 (13/13)	9,0 ± 3,3 ^b

a, b na coluna indicam médias diferentes ($P < 0,05$)

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de ter sido demonstrado, na IAT, o efeito positivo do aumento do número de espermatozóides sobre a taxa de fecundação (BAKER; DZIUK; NORTON, 1968), no experimento 1 (Tabela 1, página 39), mesmo com a utilização de 1,5 bilhão de espermatozóides foi possível obter taxas de prenhez semelhantes às obtidas em outros estudos com inseminação com 3 bilhões de espermatozóides (WATSON e BEHAN, 2002; MARTINEZ *et al.*, 2002). Quanto à determinação do melhor intervalo inseminação-ovulação para leitoas, no presente trabalho (experimento 1), índices de prenhez acima de 90% foram obtidos em leitoas inseminadas até 24 h antes da ovulação. Esse fato demonstra que, com doses armazenadas por até 48 h, é possível a adoção de protocolos de inseminação com intervalos de 24 h, para leitoas, sem que a taxa de prenhez e o número de embriões sejam reduzidos.

Foi constatado que a IAU é uma biotécnica de fácil execução e capaz de permitir a redução considerável do volume e número de espermatozóides da dose inseminante. O sucesso de passagem do cateter através da cérvix foi superior a 95%. De acordo com Levis; Burroughs; Williams (2002), a técnica não se aplica a nulíparas e primíparas. No entanto, no experimento 3, 9,7% das fêmeas inseminadas pela técnica IAU foram primíparas, sendo que foi obtido sucesso na passagem do cateter em 100% das fêmeas (15/15), demonstrando que é possível a realização da IAU nesse grupo de fêmeas.

Pela preocupação existente em relação à dificuldade de passagem do cateter em fêmeas mais jovens, poderia se esperar maior número de fêmeas primíparas com sangramento. No entanto, a presença de sangue na IAU não foi relacionada à ordem de parto, no experimento 3. Nas fêmeas de OP 1, 6,7% apresentaram sangramento. Por outro lado, nas fêmeas de ordem de parto 3 a 6, o percentual de sangramento variou de 12,5 a 14,8%, enquanto as fêmeas OP 7 e 8 apresentaram percentuais semelhantes (7,8% e 4,2%, respectivamente) ao das fêmeas de OP 1. Segundo Watson e Behan (2002), lesões pré-existentes no trato reprodutivo de determinadas fêmeas poderiam predispor a traumatismos, principalmente naquelas onde foi encontrada maior resistência à passagem do cateter. No entanto, o grau de dificuldade de passagem do cateter pela cérvix não foi avaliado no experimento 3, não sendo possível afirmar se a presença de sangramento realmente ocorreu somente naquelas fêmeas em que a passagem do cateter foi difícil.

A presença de sangue em 13 das 154 fêmeas (experimento 3; Tabela 2, página 67) inseminadas na IAU (8,4%) foi considerada um fator negativo da técnica, visto a sua influência sobre o TL, o qual foi reduzido em 2,6 leitões, em comparação ao TL das fêmeas que não apresentaram sangramento. A importância desse evento foi confirmada ao efetuar uma análise excluindo as fêmeas que apresentaram sangramento e o TL não foi mais estatisticamente diferente entre as duas técnicas. Em estudo anterior, já havia sido comprovado que a ocorrência de sangramento poderia afetar os índices reprodutivos, no caso tendo resultado em queda na taxa de prenhez (DALLANORA *et al.*, 2005). Mesmo a técnica sendo de fácil execução e tendo sido realizada com grande cuidado, em ambos os experimentos, parece que é inevitável a ocorrência de sangramento em um determinado percentual de fêmeas. Em função disso, caso a técnica de inseminação intra-uterina venha a ser adotada, é de fundamental importância um treinamento adequado da equipe executora para evitar que os índices de fêmeas com sangramento sejam ainda maiores.

Steverink *et al.* (1998) observaram que perdas por refluxo superiores a 5% do número de espermatozoides no momento da inseminação artificial tradicional afetaram negativamente a fecundação em fêmeas inseminadas com 1 bilhão de espermatozoides, mas não naquelas inseminadas com 3 e 6 bilhões, evidenciando a influência do refluxo em inseminações com baixo número de espermatozoides. Considerando que um dos principais objetivos da inseminação intra-uterina é diminuir o número de espermatozoides infundidos, a ocorrência de refluxo de sêmen com perda de espermatozoides poderia assumir maior importância com o emprego desta técnica. Mesmo com a IAU, há refluxo de cerca de 2/3 do volume de sêmen infundido, durante 1 ou 2 h após o término da inseminação (DALLANORA *et al.*, 2004; MEZALIRA, 2004). No entanto, em nenhum dos dois experimentos do presente estudo (experimento 2 e 3), em que a IAU foi utilizada, houve refluxo de sêmen durante a inseminação propriamente dita, confirmando observações anteriores (DALLANORA *et al.*, 2004; MEZALIRA, 2004). Este seria, então, um dos aspectos positivos da técnica intra-uterina, já apontado por Levis; Burroughs; Williams (2002), aspecto reforçado pelas observações de Watson e Behan (2002), os quais constataram, por raio-x contrastado, que, 5 minutos após a inseminação intra-uterina em um único corno, a dose de sêmen de 80 ml já estava totalmente distribuída em todo o útero.

Nos estudos em que foi utilizada a técnica de IAU, o momento da inseminação tem sido direcionado, seja por múltiplas inseminações, acompanhamento do desenvolvimento folicular por ultra-sonografia ou tratamento hormonal, para o intervalo de 0-24 h antes da ovulação, considerado o ideal para a inseminação tradicional. Uma das dúvidas ao utilizar a técnica de IAU é a de saber se o IAOV seria o mesmo recomendado para a IAT. Pelos resultados do experimento 2, o intervalo ideal para a IAU, com 1 ou 2 bilhões de espermatozóides, também é o de 24 h antes da ovulação, visto que, nas fêmeas inseminadas no intervalo 25 a 36 h antes da ovulação, houve redução no número de embriões. Pelo fato da taxa de prenhez e do número de embriões não serem afetados negativamente, em fêmeas inseminadas pela técnica IAU, uma única vez, com 0,5 bilhões de espermatozóides (MEZALIRA *et al.*, 2003a), era esperado que esse número de espermatozóides não comprometesse o desempenho reprodutivo das fêmeas submetidas a múltiplas inseminações, como foi o caso do experimento 3. No entanto, as inseminações múltiplas não foram capazes de impedir a redução do TL, observado nas fêmeas inseminadas com 0,5 bilhão de espermatozóides (Tabela 1, página 66). No experimento 3, as inseminações foram efetuadas com intervalos de 24 h, visto que, na inseminação tradicional, esse intervalo não comprometeu o desempenho reprodutivo das fêmeas (CASTAGNA, 2002). No entanto, o comprometimento do tamanho da leitegada com doses de 0,5 bilhão de espermatozóides, quando associado ao intervalo de 24 h entre inseminações, faz surgir a dúvida de que, talvez, com menor número de espermatozóides, o IAOV ideal poderia ser menor do que 24 h. Sobretudo em fêmeas com sangramento, esse aspecto poderia ser ainda mais crítico visto a possível redução substancial do número de espermatozóides aptos para a fecundação no momento da ovulação. Assim, são necessários mais estudos para determinar o melhor IAOV para a IAU com doses de sêmen contendo menos de 1 bilhão de espermatozóides.

Outro ponto fundamental, e que assume um papel importante na redução do número de espermatozóides é a qualidade do reprodutor e da dose inseminante utilizados. Problemas de sub-fertilidade decorrente de alterações morfológicas nas células espermáticas, inaparentes, quando utilizadas doses com 3 bilhões de espermatozóides poderiam ser detectados quando em número inferior a 1 bilhão, pois a compensação desses possíveis defeitos, pelo número de espermatozóides, deixaria de existir. Mezalira *et al.* (2003b) observaram que determinados machos apresentaram um

comportamento diferenciado na taxa de prenhez, e que este efeito foi mais pronunciado com a redução de espermatozóides.

Um dos aspectos que despertam o maior interesse quando surge uma nova biotécnica é a possibilidade de sua aplicação em condições normais de produção. Os resultados de desempenho reprodutivo obtidos no presente estudo mostram que a inseminação intra-uterina possui aplicação possível. O fato de permitir a redução do número de espermatozóides, pelo menos para 1 bilhão por dose, implicaria em aumento de 200% na produção de doses inseminantes por macho. Dessa forma, a relação macho:fêmea na inseminação tradicional, que é de, aproximadamente, 1:168, na inseminação intra-uterina passa a ser de até 1:454 (BORTOLOZZO; WENTZ; DALLANORA, 2002). No entanto, o custo da inseminação intra-uterina não segue a mesma tendência. O emprego da inseminação intra-uterina, quando comparado à inseminação tradicional, não proporciona uma redução expressiva direta no custo de inseminação das matrizes. Ou seja, aquela redução nos custos de cobertura obtidos quando se passou da monta natural para a inseminação, tenderá a não ocorrer. A viabilidade econômica da inseminação intra-uterina está vinculada ao custo do cateter utilizado para a execução da inseminação. No entanto, é possível que com o início da difusão e utilização dessa tecnologia e produção em escala do cateter ou até mesmo o desenvolvimento de novos materiais, o custo diminua. Assim, no máximo, o custo da fêmea inseminada na IAU ficará próximo ao da inseminação tradicional, mas não expressivamente inferior. Com isso, a grande expectativa com o emprego da inseminação intra-uterina ficará relacionada aos ganhos genéticos oriundos da utilização de machos geneticamente superiores.

Ao empregar a inseminação intra-uterina, deve-se estar atento às mudanças implícitas no emprego da tecnologia, pois, a partir de um ejaculado, passarão a ser produzidas 70 a 90 doses e falhas na sua produção poderão ter um impacto, proporcionalmente maior quando comparados à inseminação tradicional. Além disso, uma atenção cada vez maior deverá ser dada ao treinamento e qualificação do ser humano empregado no processo, seja no processamento dos ejaculados, seja na execução das inseminações na granja.

As perspectivas de utilização dessa nova tecnologia em sistemas tecnificados de produção suína são bastante otimistas. O presente estudo demonstrou que é possível a redução do número de espermatozóides por dose inseminante sem prejuízo a

performance reprodutiva da fêmea. No entanto, é necessário que mais investigações sejam efetuadas no sentido de melhor definir o número mínimo de espermatozoides utilizados por dose em relação ao intervalo entre as inseminações para obter alto desempenho reprodutivo.

4. CONCLUSÕES

A inseminação artificial intracervical de leitoas (experimento 1) com doses inseminantes contendo 1,5 bilhão de espermatozóides e armazenadas por 96-120 h, reduz a taxa de prenhez, número de embriões e sobrevivência embrionária, quando comparada às armazenadas por até 48 horas;

Na inseminação intracervical em leitoas, quando as doses inseminantes são armazenadas por até 48 h, a taxa de prenhez, número de embriões e sobrevivência embrionária não são afetados pelo intervalo inseminação-ovulação de até 30 h (experimento 1). No entanto, quando as doses são armazenadas por 96-120 h, a taxa de prenhez é reduzida, independentemente, do intervalo inseminação-ovulação. Por outro lado, o número de embriões e a sobrevivência embrionária não são afetados, em relação ao período de armazenamento das doses de até 48 h, quando o intervalo inseminação-ovulação é de até 23 h;

Na inseminação artificial intra-uterina (experimento 2), é possível a redução do número de espermatozóides de 2 para 1 bilhão sem afetar a taxa de prenhez, número de embriões e a sobrevivência embrionária;

O intervalo inseminação-ovulação de 25 a 36 h não afeta a taxa de prenhez e sobrevivência embrionária de fêmeas inseminadas pela técnica intra-uterina com 1 ou 2 bilhões de espermatozóides. No entanto, nesse intervalo, o número de embriões é reduzido quando comparado ao intervalo inseminação-ovulação de 0-24 h;

Na inseminação artificial intra-uterina com 0,5 bilhão de espermatozóides é possível alcançar taxas de prenhez e de parto ajustada semelhantes às obtidas na inseminação cervical com 3 bilhões de espermatozóides (experimento 3). Entretanto, o número de leitões nascidos é reduzido na inseminação intra-uterina com 0,5 bilhão de espermatozóides em comparação à inseminação cervical com 3 bilhões;

A presença de sangue no momento da inseminação intra-uterina reduz o número de leitões nascidos (experimento 3).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAKER, R.D., DZIUK, P.J., NORTON, H.W. Effect of volume of semen, number of sperm and drugs on transport of sperm in artificially inseminated gilts. **Journal of Animal Science**, v.27, p.88-93, 1968.

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

BORTOLOZZO, F. P.; WENTZ, Ivo. Incremento da eficiência reprodutiva em programas de inseminação artificial (IA) no suíno. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. 11., 1995. Belo Horizonte: **Anais**. p.131-141, 1995.

BORTOLOZZO, F. P.; WENTZ, Ivo; DALLANORA, D. Avanços na inseminação artificial de suínos. In: ENCONTRO TÉCNICO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS - RS. 2002, Estrela-RS, **Anais**. p.1-20, 2002.

BRACKEN, C.J.; *et al.* Effect of time of ovulation and sperm concentration on fertilization rate in gilts. **Theriogenology**, v.60, p. 669-676, 2003.

CASTAGNA, C.D. Fatores que influenciam no comportamento estral (estro e ovulação) em rebanhos suínos. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL MINITUB - INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM SUÍNOS. 3. Flores da Cunha-RS. **Anais**. p. 56-72, 2000.

CASTAGNA, C.D. **Considerações sobre programas de inseminação artificial em suinocultura.** 2002. 145f. Tese de doutorado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

CASTAGNA, C.D.; *et al.* The effect of post-ovulatory artificial insemination on sow reproductive performance. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 38, p. 373-376, 2003.

CASTAGNA, C.D.; BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, Ivo. Estratégias de Inseminação Artificial na Suinocultura Moderna In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS. 10. Porto Alegre. **Anais**. v.1, p.143-150, 2001.

DALLANORA, D.; *et al.* Desempenho reprodutivo de fêmeas suínas inseminadas pela técnica intra-uterina ou tradicional. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.8, p.815-819. 2005.

DALLANORA, D.; *et al.* Volume and sperm number in the semen backflow after intrauterine or cervical insemination in sows. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION. 15. Porto Seguro-BA, 2004, **Anais**, p. 387, 2004.

DIAL, G.D.; *et al.*, 1992. Reproductive failure: differential diagnosis. In: LEMAN, A.D.; STRAW, B.E.; MENGELING, W.L.; D'ALLAIRE, S.; TAYLOR, D.J. **Diseases of Swine**. 7 ed. Ames: Iowa State University Press, p. 88-137, 1992.

FLORES, L. **Comparação entre os métodos “Auto IA”, intermediário e tradicional de inseminação artificial em suínos**. 2001. 61f. **Dissertação** de Mestrado. Faculdade de Veterinária da UFRGS, Porto Alegre, Brasil.

FLOWERS, W. L.; ESBENSHADE, K. L. Optimizing management of natural and artificial matings in swine. **Journal of Reproduction and Fertility**, Supplement 48: p.217-228, 1993.

GIL, L.; TORTADES, J.M.; ALEVIA, A. Post-cervical insemination use of different volumes and sperms number. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS. 17, 2002, Ames.Iowa. USA. **Proceedings**. v.1, p.229, 2002.

HANCOCK, J.L. Pig Insemination Technique. **The Veterinary Record**, v.26, p.523-527, 1959.

HANCOCK, J.L.; HOWELL, G.J.R. The effect of semen volume and number of spermatozoa on the fertility of intra-uterine inseminations of pigs. **Animal Production**, v.3, p.153-160, 1961.

HECK, A.; *et al.* Determinação do momento da ovulação e avaliação da duração do estro e momento da ovulação em leitoas com auxílio da ultra-sonografia. In: CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS.8. Foz do Iguaçu, Paraná. **Anais**. p. 331-332, 1997.

HUNTER, R.H.F. The effects of delayed insemination on fertilization and early cleavage in the pig. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.13, p.133-147, 1967.

HUNTER, R, H, F. Causes for failure of fertilization in domestic species. In: ZAVY, M. T. & GEISERT, R. D. **Embryonic Mortality in Domestic Species**, CRC, cap.1, p.1-22, 1994.

KEMP, B.; SOEDE, N. M. Consequences of variation in interval from insemination to ovulation on fertilization in pigs. **Journal of Reproduction and Fertility**, Supplement 52: p. 79-89, 1997.

KRUGER, C.; RATH, D. Intrauterine insemination in sows with reduced sperm number. **Reproduction Fertility and Development**, v.12, p.113-117, 2000.

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

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

LEVIS, D.G.; BURROUGHS, S.; WILLIAMS, S. Use of intrauterine insemination of pigs: pros, cons & economics. Ohio Pork Industry Center. The Ohio University extension. 2002. Disponível em <www.porkinfo.osu.edu/Word%20Documents/AIintrauterineDL.doc>. Acesso em: 20 mar. 2004.

MARCHETTI, A.N. **Caracterização do perfil estral do rebanho, utilização de diferentes números de espermatozóides na dose e efeito de inseminações artificiais pré e pós ovulatórias sobre o desempenho reprodutivo de suínos**. 2001. 66f. **Dissertação** de Mestrado Faculdade de Veterinária. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

MARTINEZ, E.A.; *et al.* Successful non-surgical deep intrauterine insemination with small numbers of spermatozoa in sows. **Reproduction**, v.122, p.289-296, 2001.

MARTINEZ, E.A.; *et al.* Minimum number of spermatozoa required for normal fertility after deep intrauterine insemination in non-sedated sows. **Reproduction**, v.123, p.163-170, 2002.

MEZALIRA, A. **Influência do número de espermatozóides na dose e do refluxo pós-inseminação sobre o desempenho reprodutivo de fêmeas suínas inseminadas intrauterinamente**. 2004. 43f. **Dissertação** de Mestrado Faculdade de Veterinária. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

MEZALIRA, A.; *et al.* Inseminação intra-uterina em fêmeas suínas com redução no volume e número de espermatozóides. In: CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS.11. Goiânia, GO. **Anais**. p.217-218, 2003a.

MEZALIRA, A.; *et al.* Desempenho reprodutivo de fêmeas suínas de acordo com o macho utilizado na inseminação intra-uterina. In: CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS.11. Goiânia, GO. **Anais**. p.219-220, 2003b.

MORRIS, L.H.A.; HUNTER, R.H.F.; ALLEN, W.R. Hysteroscopic insemination of small numbers of spermatozoa at the uterotubal junction of preovulatory mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.118, p.95-100, 2000.

NISSEN, A. K.; *et al.* The influence of time of insemination relative to time of ovulation on farrowing frequency and litter size in sows, as investigated by ultrasonography. **Theriogenology**, v.47, p.1571-1582, 1997.

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

POLGE, C. Artificial insemination in pigs. **The Veterinary Record**, v.68, p.62-76, 1956.

RATH, D.; KRUEGER, C.; JOHNSON, L. A. Low dose insemination technique in the pig. In: BOAR SEMEN PRESERVATION. 4. Beltsville, Maryland, USA. 1999. **Anais**.p. 115-118, 2000.

REIS, G.R.; *et al.* Identificação de cachacos com diferentes períodos de viabilidade *in vitro*. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL MINITUB-INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM SUÍNOS. 3., 2000, Flores da Cunha-RS. **Anais**. p.42-49, 2000.

ROCA, J.; *et al.* Fertility of cryopreserved boar spermatozoa after transcervical deep intrauterine insemination. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 385, 2002.

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

SCHEID, I.; *et al.* Comparação entre diluentes para conservação de sêmen suíno no estado líquido: resultados *in vitro*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS. 6. Goiânia-GO. **Anais**. p.122. 1993.

SEIDEL, G.E. Jr., *et al.* Uterine horn insemination of heifers with very low numbers of nonfrozen and sexed spermatozoa. **Theriogenology**, v.48. p.1255-1264, 1997.

SOEDE, N. M.; KEMP, B. Expression of oestrus and timing of ovulation in pigs. **Journal of Reproduction and Fertility**, Supplement 52, p.91-103, 1997.

SOEDE, N. M.; WETZELS, C. C. H.; KEMP, B. Oestrus (standing response for boar and man) and ovulation in sows. **Reproduction in Domestic Animals**, v.31, p.293-294, 1996, abstract.

SOEDE, N. M.; *et al.* Effect 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**, v.104, p.99-106, 1995a.

SOEDE, N. M.; *et al.* Effect of a second insemination after ovulation on fertilization rate and accessory sperm count in sows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.105, p.135-140, 1995b.

STEVERINK, D.W.B.; SOEDE, N.M.; BOUWMAN, G.; KEMP, B. Influence of insemination-ovulation interval and sperm cell dose on fertilization in sows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 111, p. 165-171, 1997.

STEVERINK, D.W.B.; *et al.* Semen backflow after insemination and its effect on fertilization results in sows. **Animal Reproduction Science**, v.54, p.109-119. 1998.

STEVERINK, D.W.B.; *et al.* Duration of estrus in relation to reproduction results in pigs on commercial farms. **Journal of Animal Science**, v.77, p.801-809, 1999.

STOKHOF, S.; SOEDE, N.M.; KEMP, B. Vaginal mucus conductivity as measured by Walsmeta MKIV does not accurately predict the moment of ovulation in sows. **Animal Reproduction Science**, v. 41, p. 305-310, 1996.

STRATMAN, F.W; SELF, H.L. Effect of semen volume and number of sperm on fertility and embryo survival in artificially inseminated gilts. **Journal of Animal Science**, v.19. p.1081-1088. 1960.

UEMOTO, D. A. **Comportamento estral e desempenho reprodutivo de leitoas submetidas à inseminação artificial em diferentes períodos pré-ovulatórios.** 1999. 96f. **Dissertação** de mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, Brasil.

VASQUEZ, J.M.; *et al.* Deep intrauterine insemination in sows with flow cytometric sorted sperm. **Theriogenology**, v.57, n.1, p.389, 2002.

VESSEUR, P.C., 1997. **Causes and consequences of variation in weaning to oestrus interval.** 165f. **Ph.D thesis.** Research Institute for Pig Husbandry. The Netherlands.

WABERSKI, D.; *et al.* The initial fertilizing capacity of longterm-stored liquid boar semen following pre- and postovulatory insemination. **Theriogenology**, v.41. p. 1367-1377, 1994a.

WABERSKI, D.; *et al.* Effect of time of insemination relative to ovulation on fertility with liquid and frozen boar semen. **Theriogenology**, v. 42, p.831-840, 1994b.

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

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

WEITZE, K. F.; *et al.* The onset of heat after weaning, heat duration, and ovulation as major factors in AI timing in sows. **Reproduction in Domestic Animals**, v.29, p.433-443, 1994.

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

WENTZ, I.; *et al.* Avaliação da duração do estro e momento da ovulação em leitoas com auxílio da ultra-sonografia. In: CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS.8. Foz do Iguaçu, Paraná. **Anais**. p. 331-332, 1997.

WENTZ, Ivo; BORTOLOZZO, F.P. Inseminação artificial em suínos. In: SOBESTIANSKY, J.; WENTZ, Ivo. Suinocultura Intensiva: Produção, Manejo e Saúde do Rebanho. 2 ed. Concórdia-SC, 1998.

WENTZ, Ivo; *et al.* Situação atual da Inseminação Artificial em Suínos no Brasil e Viabilização do emprego dessa biotécnica. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL MINITUB - INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM SUÍNOS. 3. Flores da Cunha. **Anais**, p. 5-12, 2000.

WOELDERS, H.; MATTHIJS, A. Phagocytosis of boar spermatozoa in vitro and in vivo. **Journal of Reproduction and Fertility**, Supplement 58, p.113-127, 2001.

WOLKEN, A.; *et al.* Sows can successfully be inseminated non-surgically into the distal uterine horn with a highly reduced number of sperm cells. **Theriogenology**, v.57, p.392, 2002.