

## Sobrevivência espermática em diferentes taxas de diluição do sêmen do varrão

*Spermatic survival at different dilutions taxes in the swine semen*

MATOS, Darlete Lima<sup>1</sup>; ARAUJO, Airton Alencar de<sup>2</sup>; ROBERTO, Iara Gonçalves<sup>1</sup>;  
TONIOLLI, Ricardo<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Universidade estadual do Ceará, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Fortaleza, Ceará, Brasil.

<sup>2</sup>Universidade Estadual do Ceará, Faculdade Veterinária, Fortaleza, Ceará, Brasil.

\*Endereço para correspondência: tonioli@roadnet.com.br

### RESUMO

O objetivo, no trabalho, foi avaliar o efeito do número de espermatozoides por dose inseminante (DI) sobre a qualidade espermática, a fim de determinar um número mínimo de células na inseminação artificial (IA), sem alterar a qualidade de fertilização do sêmen. O ejaculado de quatro reprodutores foi coletado (n = 40) e, após avaliação do volume, concentração, vigor e motilidade espermática, foi diluído em BTS e conservado por 3 dias a 17 °C. A sobrevivência e os parâmetros de motilidade espermática foram avaliados pelo sistema automatizado CASA a cada 24 horas. As análises *in vitro* mostraram que as DI de 2 e 3,5x10<sup>9</sup>sptz apresentaram a maior sobrevivência espermática e parâmetros de motilidade compatíveis aos padrões de qualidade exigidos para uso na IA. Com base nos resultados *in vitro* 90, fêmeas foram inseminadas, divididas em três grupos: 30 fêmeas com 3,5x10<sup>9</sup> sptz, usando pipeta Goldenpig; 30 fêmeas com 2 x10<sup>9</sup>sptz e 30 com 3,5x10<sup>9</sup>sptz, usando pipeta Goldengilt. Não houve diferenças significativas nas taxas de parição quando comparadas às DI de 2 e 3,5 x10<sup>9</sup>sptz. Concluiu-se que uma redução limitada do número de espermatozoides na DI não comprometeu as taxas reprodutivas, possibilitando inseminar um maior número de fêmeas com um mesmo ejaculado.

**Palavras-chave:** dose inseminante, inseminação artificial, sêmen suíno

### SUMMARY

The objective, in this work, was to evaluate the effect of the number of sperm per insemination dose (ID) on the spermatic quality, to determine the minimum number of cells in artificial insemination (AI), without affecting the semen fertilization quality. The semen was collected from four boars (n = 40) and, after assessing the volume, concentration and sperm motility, it was diluted in BTS and stored for 3 days at 17° C. Sperm survival and parameters of sperm motility were assessed, every 24 hours, by CASA automatic. The doses of 2 and 3x10<sup>9</sup>sptz showed *in vitro* the better results of survival and sperm motility. Based on *in vitro* results, 30 sows were inseminated with 3.5x10<sup>9</sup>sptz, using pipette Goldenpig, 30 females were inseminated with 2x10<sup>9</sup>sptz and 30 females were inseminated with 3.5x10<sup>9</sup>sptz, with pipette Goldengilt. There was no difference in fertility rates when comparing the ID of 2 and 3.5x10<sup>9</sup>sptz (93% for all doses). In conclusion, the limited reduction of the number of sperm in the ID did not affect fertility rates allowing the insemination of a great number of sows.

**Keywords:** artificial insemination, boar semen, inseminating dose

## INTRODUÇÃO

No Brasil, existem granjas que utilizam tecnologia avançada, apresentando níveis semelhantes aos praticados nos países desenvolvidos (SILVA FILHO et al., 2008), uma vez que, na suinocultura, moderna além do emprego de técnicas de manejo e melhoramento genético, o processo reprodutivo assume um papel fundamental por ser um fator decisivo para a lucratividade, sendo então necessário o desenvolvimento e aperfeiçoamento de técnicas que permitam uma maior eficiência reprodutiva (STEVERINK et al., 1998).

Sendo assim, vale ressaltar a importância da inseminação artificial (IA), como uma biotécnica reprodutiva, na qual um dos principais objetivos é a potencialização do uso de machos geneticamente superiores. Na espécie suína, os primeiros relatos do uso da IA datam de 1932 na antiga União das Repúblicas Socialistas Soviéticas e, desde então, tem sido registrado um constante aumento de sua aplicação em todo o mundo (BORTOLLOZO & WENTZ, 1997).

Nos últimos 30 anos, novas tecnologias têm sido desenvolvidas para a aplicação na IA em suínos, alcançando avanços, tais como melhores diluentes, novos métodos para avaliação do ejaculado e otimização do manejo dos reprodutores. Entretanto, poucas modificações foram feitas com relação ao número de espermatozoides e volume da dose inseminante (DI), além da técnica de inseminação artificial propriamente dita (MARTINEZ et al., 2001; BORTOLOZZO et al., 2005).

Ao longo de 50 anos de utilização da IA suína, algo em torno de  $2,5$  a  $4 \times 10^9$  espermatozoides em um volume entre 80 a 100 mL de diluente têm sido recomendados para alcançar o máximo

de fertilidade, tanto na IA convencional quanto na intracervical. Um grande volume de espermatozoides, por dose inseminante, é necessário, devido às características anatômicas da cérvix e dos cornos uterinos da fêmea suína (STEVERINK et al., 1998; WATSON & BEHAN, 2002). Porém, estudos recentes têm demonstrado que é possível reduzir o número de células espermáticas, assim como o volume da dose inseminante (DI), sem prejuízo à fertilidade, quando a deposição do sêmen é realizada após a cérvix (WATSON & BEHAN, 2002).

Martinez et al. (2001) demonstraram que é possível manter a taxa de concepção e a prolificidade em limites aceitáveis quando as fêmeas são inseminadas com um menor número de espermatozoides depositados próximo à junção útero tubária, sendo relatadas inseminações intrauterinas profundas (IIUP) bem sucedidas com 200 a 500 milhões e/ou 1 bilhão de espermatozoides em um volume de 10mL (MARTINEZ et al., 2002). Krueger e Rath (2000) relataram resultados satisfatórios, sem decréscimo no potencial de fertilização com deposição cirúrgica de  $1 \times 10^7$  spz em 0,5mL. No entanto, a deposição pós-cervical necessita de instrumentos adequados, e a técnica cirúrgica não pode ser realizada de forma rotineira, apresentando, em ambos os casos, alto custo, o que inviabiliza sua aplicação.

Assim, é real a necessidade de soluções técnicas não cirúrgicas para a IA, com um reduzido número de espermatozoides, de forma a potencializar o emprego de machos geneticamente superiores e reduzir os custos de produção. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do número decrescente de espermatozoides em doses de sêmen utilizadas na IA de fêmeas suínas, por meio de diferentes pipetas de inseminação.

## MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no Laboratório de Reprodução Suína e Tecnologia do Sêmen (LRSTS) e no Laboratório de Tecnologia do Sêmen Caprino e Ovino (LTSCO) da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará (FAVET/UECE), localizados na latitude sul  $-03^{\circ} 43' 02''$  e longitude oeste  $38^{\circ} 32' 35''$  e, na Granja Regina, no município de Maranguape, Ceará.

Foram utilizados 4 machos Dalland com idade média de 3 anos, alojados em baias individuais dispostas lado a lado, alimentados com 2Kg/dia de ração balanceada e água *ad libitum*. O sêmen dos reprodutores foi coletado uma vez por semana durante 10 semanas consecutivas por meio da técnica da mão enluvada. A colheita foi realizada em um recipiente plástico com capacidade de 500ml, previamente aquecido a  $37^{\circ}\text{C}$ , coberto com gaze e protegido em copo isotérmico. Após separação da fração gelatinosa, o ejaculado foi avaliado quanto ao volume (mL), à concentração ( $\times 10^6$  sptz/ml), temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ), ao total de células ( $\times 10^9$  sptz), ao vigor espermático (0 a 5 – Toniolli, 1996) e à motilidade espermática (%). Para as análises do vigor e da motilidade espermática, foram utilizadas alíquotas de 10  $\mu\text{L}$  do sêmen *in natura*, colocadas entre lâmina e lamínula para observação em microscopia óptica a um aumento de 200x. Somente os ejaculados com valores de motilidade  $\geq 80\%$  foram utilizados no experimento. Após essa análise, o sêmen de cada macho foi diluído a uma temperatura entre 32 a  $34^{\circ}\text{C}$  no Beltsville Thawing Solution (BTS), utilizando-se dois volumes finais diferentes para as dose de sêmen, com um número total de espermatozoide de  $1 \times 10^9$  sptz,  $2 \times 10^9$  sptz em 80ml e  $3,5 \times 10^9$  sptz em 100mL (controle), envazados em garrafinhas plásticas.

O sêmen diluído e envazado foi transportado da granja onde foi coletado até o LRSTS na UECE em caixa térmica, juntamente com bisnagas de ácido acético congelado. O período máximo de transporte entre o local de coleta e o laboratório foi de 1 hora, em que foi mantido sob refrigeração entre 15 e  $17^{\circ}\text{C}$  por 3 dias e separado em amostras de 5mL envazadas em tubos de ensaio. Os parâmetros de motilidade foram avaliados nos dias D0 (dia da coleta, 6hs após processamento), D1, D2 e D3 (último dia de conservação).

A cada dia de análise (D0, D1, D2 e D3) foi retirada uma amostra, reaquecida por 5 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . Uma gota de 10 $\mu\text{L}$  foi colocada em câmara de Makler, previamente aquecida, com 10mm de profundidade, sendo a motilidade espermática analisada pelo o sistema CASA (SCA Microptic S.L., Barcelona, Espanha). Nessa análise, examinaram-se cinco imagens digitalizadas consecutivas obtidas de campos diferentes, com uso de objetiva de 20x e contraste de fase. Além disso, foram avaliados os parâmetros de velocidade média da trajetória dos espermatozoides (VAP,  $\mu\text{m/s}$ ), linearidade (LIN, %) e porcentagem de móveis (%). As células com velocidade abaixo de 10 $\mu\text{m/s}$  foram consideradas imóveis, até 25 $\mu\text{m/s}$ , com movimento local, e acima de 25 $\mu\text{m/s}$ , com movimento retilíneo progressivo.

De cada tratamento, foi realizado um esfregaço de sêmen, a fim de se proceder às análises morfológica e de viabilidade espermática. A solução corante foi constituída por 0,1g de azul de bromofenol + 0,4g de citrato de sódio e 10 mL de água destilada. Foi medida a osmolaridade da solução e, quando necessário, ajustada com água destilada para valores entre 300 e 310 mOsm. Os esfregaços de sêmen foram sempre feitos após 10 minutos de incubação, preparados no dia da coleta (D0), dois

dias após (D2) e no último dia de conservação (D3), para análise morfológica e exames de viabilidade espermática. Na preparação do esfregaço, juntou-se uma gota de sêmen a outra de corante, à mesma temperatura, ocorrendo homogeneização. Após 30 segundos, retirou-se uma gota dessa mistura e realizou-se o esfregaço que permaneceu em temperatura ambiente até antes da análise.

Segundo a morfologia do acrossoma e vitalidade, os espermatozoides foram classificados em 3 categorias: espermatozoides vivos com acrossoma intacto, espermatozoides vivos com acrossoma danificado e espermatozoides mortos. Para a morfologia espermática total, avaliaram-se problemas de cabeça, cauda, peça intermediária e presença de gota citoplasmática proximal, e os espermatozoides foram classificados em normais e danificados. Foram avaliadas 200 células, por amostra, através da microscopia óptica a um aumento de 400x.

As inseminações artificiais foram realizadas em 90 fêmeas pluríparas da variedade Dalland, com ordem de parto entre 1 e 9, distribuídas aleatoriamente entre os diferentes tratamentos. Foi utilizado, para as IA, o sêmen dos mesmos reprodutores da etapa anterior do trabalho, sendo a coleta do ejaculado e diluição realizadas como na etapa anterior, preparando-se doses com 2,0 e  $3,5 \times 10^9$  sptz, de acordo com os resultados *in vitro*.

A detecção do estro foi realizada 2 vezes ao dia pelo reflexo de tolerância ao homem na presença do macho. As fêmeas foram inseminadas três vezes/estro com intervalos de 12 horas entre IA, sendo a primeira IA efetuada 12 horas após o diagnóstico dos sintomas positivos de cio. As fêmeas foram distribuídas aleatoriamente em 3 tratamentos: 30 fêmeas inseminadas

com doses de  $3,5 \times 10^9$  sptz/100mL, com pipeta Goldenpig-IMV (controle); 30 fêmeas inseminadas com doses de  $3,5 \times 10^9$  sptz/100 ml, com pipeta Goldengilt-IMV; 30 fêmeas inseminadas com doses de  $2,0 \times 10^9$  sptz/80 ml, com pipeta Goldengilt-IMV. A pipeta Goldengilt, específica para leitoas, consiste num modelo padrão de um tubo de polipropileno (7mm), que, em vez da esponja usual, com extremidade de 25 mm, apresenta esponja de formato cônico, reduzindo a extremidade para 17mm, sendo um pouco mais alongada e permitindo deposição intra-cervical do sêmen 0,5 cm mais profundo no genital (WATSON & BEHAN, 2002).

As fêmeas que não retornaram ao cio entre os dias 18 e 25, após IA, foram consideradas como gestantes. Para avaliação da capacidade fecundante das DI, coletaram-se dados relativos ao número de matrizes inseminadas, número matrizes fertilizadas, número total de leitões nascidos e leitões nascidos vivos. A partir desses dados, foram calculadas as taxas de não retorno ao estro, parição e leitões nascidos vivos. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso, com as análises estatísticas realizadas por meio do programa SYSTAT versão 7.0 (1997). Foram comparadas as características de motilidade, de vitalidade e morfologia espermática entre tratamentos, com avaliação por ANOVA. Posteriormente, aplicou-se teste de Tukey para comparação entre médias (média  $\pm$  desvio padrão) dos diferentes tratamentos. Considerou-se um intervalo de confiança de 5% (diferenças significativas com  $p < 0,05$ ). As taxas de retorno ao estro, parição e leitões nascidos vivos foram avaliadas pelo teste do Qui-quadrado.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A motilidade progressiva do espermatozoide é um indicativo de metabolismo normal da célula espermática e de uma membrana intacta e sua estimativa tem fundamental importância no controle da qualidade diária do sêmen diluído e estocado (JOHNSON et al., 2000). A avaliação da motilidade espermática por períodos prolongados é importante uma vez que as diluições são normalmente altas e a presença de plasma, seminal é bastante diminuída (BORTOLLOZO et al., 2005).

O monitoramento desse parâmetro, ao longo dos dias de conservação, foi executado de forma objetiva. Os resultados revelaram que foi significativa ( $p < 0,05$ ) a redução da porcentagem de espermatozoides móveis, assim como da VAP e LIN. As DI de  $1 \times 10^9$  sptz apresentaram os menores valores de células móveis ( $13 \pm 2,9$ ), bem como de VAP ( $19 \pm 3,5$ ) e de LIN ( $19 \pm 3,5$ ). Em comparação com os demais tratamentos, foram observadas doses de  $2 \times 10^9$  sptz (móveis =  $30 \pm 5,0$ ; VAP =  $28 \pm 3,3$  e LIN =  $37 \pm 3,3$ ) e de  $3,5 \times 10^9$  sptz (móveis =  $46 \pm 6,0$ ; VAP =  $34 \pm 2,6$  e LIN =  $38 \pm 2,6$ ). Esse comportamento se repetiu ao longo dos dias de conservação do sêmen (Tabela 1).

Tabela 1. Avaliação objetiva (CASA) das características de motilidade espermática do sêmen suíno, com diferentes totais de espermatozoides em doses inseminantes, conservadas por 72 horas

Parâmetro	Doses (sptz)			
	Dia	$1 \times 10^9$	$2 \times 10^9$	$3,5 \times 10^9$
Motilidade (%)	D0	$13 \pm 2,9^{Aa}$	$30 \pm 5,0^{Ab}$	$46 \pm 6,0^{Ac}$
	D1	$10 \pm 2,6^{Aa}$	$30 \pm 4,7^{Ab}$	$45 \pm 5,6^{Ac}$
	D2	$11 \pm 3,9^{Aa}$	$32 \pm 6,8^{Ab}$	$49 \pm 6,6^{Ac}$
	D3	$6 \pm 2,1^{Aa}$	$31 \pm 6,8^{Ab}$	$47 \pm 6,6^{Ac}$
VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	D0	$19 \pm 3,5^{Aa}$	$28 \pm 3,3^{Aa,b}$	$34 \pm 2,6^{Ab}$
	D1	$20 \pm 3,2^{Aa}$	$32 \pm 2,8^{Ab}$	$37 \pm 1,9^{Ab}$
	D2	$14 \pm 3,3^{Aa}$	$31 \pm 2,8^{Ab}$	$39 \pm 2,2^{Ab}$
	D3	$11 \pm 2,4^{Aa}$	$30 \pm 2,9^{Ab}$	$35 \pm 1,6^{Ab}$
LIN (%)	D0	$19 \pm 3,5^{Aa}$	$37 \pm 3,3^{Ab}$	$38 \pm 2,6^{Ab}$
	D1	$19 \pm 3,1^{Aa}$	$32 \pm 2,8^{Ab}$	$38 \pm 1,9^{Ab}$
	D2	$13 \pm 3,3^{Aa}$	$30 \pm 2,7^{Ab}$	$37 \pm 1,2^{Ab}$
	D3	$10 \pm 2,4^{Aa}$	$30 \pm 2,1^{Ab}$	$35 \pm 1,6^{Ab}$

<sup>A,B, a,b,c</sup> Letras diferentes, diferenças significativas entre valores na mesma linha ( $p < 0,05$ ).

Por outro lado, não foram registradas diferenças significativas entre os parâmetros anteriormente analisados dentro de um mesmo tratamento, no decorrer dos dias de conservação, apesar do decréscimo dos valores ao longo do período desse período.

Entretanto, esse tipo de resultados não é uma tônica, e diferenças significativas, na motilidade espermática como na VAP e LIN (BENNEMANN et al., 2000; DUBE et al., 2004; TEJERINA et al., 2008), podem ser encontradas ao longo do período de estocagem das

doses, quando são utilizados diferentes diluentes para o sêmen.

Os resultados encontrados neste trabalho ficaram abaixo dos demonstrados pelos referidos autores, fato que pode ser justificado pelas condições de transporte das DI da granja ao laboratório. Ainda assim, os achados foram consistentes, e as amostras apresentaram comportamento de queda, ao longo da conservação, semelhante aos demonstrados por Murgas et al. (2002), que obteve motilidade espermática de 70% na avaliação em 0h, 63% em 24h e 55% em análise com 48h.

A avaliação precoce das doses até 72h (D3), período no qual os espermatozoides ainda se encontram sob a garantia de proteção de um diluidor de curta duração, como o BTS, pode explicar ao menos em parte a ausência de diferenças significativas entre tratamentos ao longo desse período. O sêmen suíno, mesmo conservado diluído e resfriado, apresenta um decréscimo de sua qualidade com o passar do tempo, particularmente devido a sua alta sensibilidade quando submetido a períodos prolongados de frio. Esse fato ocorre independente da taxa de diluição ou das condições de armazenamento do sêmen (HAUGAN et al., 2007).

Com o decorrer da conservação, houve um acúmulo de produtos tóxicos do metabolismo dos espermatozoides, especialmente os metabólitos oxigênio-reativos que provocam a peroxidação lipídica, levando a danos da célula espermática com perda da motilidade e redução da capacidade de fertilização em várias espécies domésticas (CEROLINI et al., 2000). O ataque oxidativo mostrou ter influência sobre a membrana do espermatozoide suíno, assim, a redução dos valores de motilidade, VAP e LIN, no sêmen

resfriado, ocorreu provavelmente devido a tais efeitos.

Após a diluição do sêmen (D0), verificou-se que, na relação entre o número de células e o volume de diluente de cada dose (Tabela 1), houve um decréscimo significativo ( $p < 0,05$ ) da motilidade espermática entre as diferentes DI. Essa queda dos valores ( $13 \pm 2,9$ ) foi maior nas doses com menor número total de espermatozoides. Nos outros tratamentos, os resultados melhoraram à medida que o total de células/DI foi aumentado. As DI com  $3,5 \times 10^9$  sptz, ou seja, com o maior número de células e conseqüente menor taxa de diluição, apresentaram o melhor resultado de motilidade, com  $46 \pm 5,0$  espermatozoides móveis.

Esses resultados, diferentes dos observados por outros autores (ARAUJO, 2000; HAUGAN et al., 2007), demonstraram que o reduzido número de células espermáticas nas DI, favorecidos por diluições excessivas do ejaculado do varrão, levaram a uma considerável perda da viabilidade celular e da motilidade, fato confirmado por outros trabalhos (CEROLINE et al., 2000), que verificaram uma rápida perda da qualidade espermática após extensa diluição do ejaculado, em ausência de plasma seminal.

Uma vez que o ejaculado do varrão já apresenta um grande volume, sendo naturalmente mais diluído do que o de outras espécies domésticas, a inclusão de um maior volume de diluente e adicionalmente uma diluição do plasma seminal e tem como função proteger o espermatozoide contra o choque térmico. Sua ação benéfica, junto à preservação da qualidade do sêmen, pode estar diminuída ou mesmo anulada, o que em parte pode explicar os resultados deste trabalho (CEROLINE et al., 2000).

O cálculo das taxas de diluições utilizadas revelou variações de 1:18 a 1:32 (média de 1:24) nas DI de  $1 \times 10^9$  sptz; de 1:9 a 1:16 (média de 1:12), nas DI de  $2 \times 10^9$  sptz e de 1:6 a 1:11 (média de 1:8) nas DI de  $3,5 \times 10^9$  sptz. Dessa forma, verificou-se que, nas DI com menor número de espermatozoides, aconteceu a maior taxa média de diluição do sêmen, bem como a maior variação dessa taxa. A razão pela qual ocorre uma redução da fertilidade e viabilidade espermática das DI submetidas a uma alta taxa de diluição ( $>1:15$ ) não é totalmente conhecida, e a diluição do plasma seminal pode ser uma das explicações.

O plasma seminal tem um papel importante na manutenção da viabilidade espermática durante a estocagem (HOU et al., 2002), uma vez que possui um complexo sistema antioxidante, que previne os danos causados pelos radicais livres sob condições fisiológicas normais. Somente o sistema antioxidante celular não é potente o bastante para prevenir a peroxidação lipídica, particularmente durante a estocagem *in vitro*, quando a produção de radicais livres pode ser resultante de mudanças metabólicas (CEROLINE et al., 2000; BOEHANSEN et al., 2005). A redução do volume do plasma seminal pode explicar o que se observou nas DI de  $1 \times 10^9$  sptz. A excessiva diluição reduziu a concentração de proteínas, antioxidante natural, além de outros componentes requeridos para a função normal e integridade da membrana plasmática, apresentando, dessa forma, um efeito negativo sobre a sobrevivência espermática *in vitro*.

Foi observado que o período de estocagem do sêmen e número total de espermatozoides/dose tiveram um efeito negativo na vitalidade espermática. A porcentagem de células vivas com

acrossoma intacto diminuiu progressivamente, em todos os tratamentos, enquanto que a porcentagem de espermatozoides vivos com acrossoma danificados e de espermatozoides mortos aumentou, no decorrer do período de conservação (Tabela 2). A dose de  $1 \times 10^9$  sptz apresentou as menores porcentagens de células viáveis durante todo o período de conservação (D0 =  $85 \pm 1,1$ ; D1 =  $67 \pm 2,4$  e D3 =  $53 \pm 3,2$ ) quando comparada com a dose de  $2 \times 10^9$  sptz (D0 =  $87 \pm 1,2$ ; D1 =  $69 \pm 1,6$  e D3 =  $59 \pm 2,4$ ), com diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) já a partir de D1. As doses de  $3,5 \times 10^9$  sptz (D0 =  $89 \pm 0,7$ ; D1 =  $75 \pm 1,6$  e D3 =  $63 \pm 3,2$ ) apresentou, durante todo o período de conservação do sêmen, as melhores porcentagens de células vivas com acrossoma intacto, em relação aos outros dois tratamentos. Com relação ao número de células mortas (D0 =  $11 \pm 1,0$  e D3 =  $45 \pm 3,4$ ), foi significativamente menor nas doses menos diluídas, de  $2 \times 10^9$  sptz (D0 =  $10 \pm 1,2$  e D3 =  $36 \pm 2,3$ ) e de  $3,5 \times 10^9$  sptz (D0 =  $10 \pm 0,6$  e D3 =  $32 \pm 3,0$ ).

Com relação ao número de espermatozoides vivos com acrossoma danificado, não foram observadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre os diferentes tratamentos ao longo do período de conservação do sêmen, apesar de uma pequena variação, dentro de tratamento, ao longo dos dias de análise (Tabela 2). Esse aumento de 1% para 4,2% na DI de  $1 \times 10^9$ , de 1% para 3,9% na DI  $2 \times 10^9$  e de 1% para 3% na DI de  $3,5 \times 10^9$  era esperado, uma vez que, segundo alguns autores, o espermatozoides suínos mantidos sob refrigeração *in vitro* perdem gradualmente seus acrossomas (ALTHOUSE et al., 1998; HOU et al., 2002).

Como a célula espermática depende de seu acrossoma para uma penetração

bem sucedida da zona pelúcida, o número de espermatozoides danificados na DI poderá afetar o potencial de fertilização, porém, em porcentagem

baixa, o aumento de alterações espermáticas não comprometerá os resultados de fertilidade (WATHERHOUSE et al., 2004).

Tabela 2. Qualidade acrossomal e vitalidade espermática no sêmen suíno, em amostras de doses inseminantes com diferentes números de espermatozoides

Total de sptz	Vivo intacto			Vivo danificado		
	D0	D2	D3	D0	D2	D3
1x10 <sup>9</sup>	85±1,1 <sup>aA</sup>	67±2,4 <sup>bA</sup>	52±3,2 <sup>cA</sup>	1±0,3 <sup>aA</sup>	2±0,5 <sup>abA</sup>	4,2±0,7 <sup>bA</sup>
2x10 <sup>9</sup>	87±1,2 <sup>aA</sup>	69±1,6 <sup>bAB</sup>	59±2,4 <sup>cA</sup>	1±,3 <sup>aA</sup>	2±0,4 <sup>abA</sup>	3,9±0,6 <sup>bA</sup>
3.5x10 <sup>9</sup>	89±0,7 <sup>aA</sup>	75±1,6 <sup>bB</sup>	63±3,2 <sup>cB</sup>	1±0,2 <sup>aA</sup>	1± 0,3 <sup>bA</sup>	3±0,7 <sup>cA</sup>

<sup>A,B,a,b,c</sup> Letras diferentes, diferenças significativas entre valores na mesma linha (p < 0,05).

Estudos recentes evidenciaram o efeito negativo do tempo de estocagem sobre a morfologia espermática (WATHERHOUSE et al., 2004), entretanto, um achado interessante neste trabalho foi a falta desse efeito sobre a característica morfológica do espermatozoide suíno (Tabela 3). Isso ocorreu, possivelmente, devido ao fato de que os machos utilizados eram animais selecionados de acordo com um padrão mínimo de qualidade espermática, e o período de conservação foi relativamente curto.

As características da morfologia espermática não mudaram entre as DI testadas e nem em uma mesma DI ao longo do período de conservação do sêmen. Não foi evidenciado efeito do número de células/dose sobre o aparecimento de células danificadas durante a conservação do sêmen, e os valores ficaram dentro da faixa aceitável com anormalidades abaixo de 20%, indicando um sêmen potencialmente fértil (HAUGAN et al., 2007).

Tabela 3. Morfologia espermática do sêmen suíno diluído de acordo com o número de espermatozoides por dose inseminante e período de conservação

Total de sptz	Normal			Danificado		
	D0	D2	D3	D0	D2	D3
1 x10 <sup>9</sup>	83±1,5 <sup>aA</sup>	81± 1,6 <sup>aA</sup>	82± 1,7 <sup>aA</sup>	17±1,5 <sup>aA</sup>	19±1,6 <sup>aA</sup>	18± 2,0 <sup>aA</sup>
2 x10 <sup>9</sup>	83±1,3 <sup>aA</sup>	80± 3,6 <sup>aA</sup>	80± 2,2 <sup>aA</sup>	17± 2,2 <sup>aA</sup>	20± 1,2 <sup>aA</sup>	20± 2,2 <sup>aA</sup>
3,5 x10 <sup>9</sup>	83±1,4 <sup>aA</sup>	83± 1,5 <sup>aA</sup>	80± 2,1 <sup>aA</sup>	17± 1,3 <sup>aA</sup>	17± 1,5 <sup>aA</sup>	20± 1,7 <sup>aA</sup>

<sup>A,a</sup> Letras diferentes, diferenças significativas entre valores na mesma linha (p < 0,05).

Nas diferentes amostras avaliadas, foram encontrados os seguintes valores percentuais para as alterações morfológicas: 1% de cabeça alterada, 8

% de acrossoma alterado, 5% de alterações na peça intermediária, 10% de alterações da cauda e 4% de gota citoplasmática proximal em todos os



tratamentos. Entre as alterações, destacou-se a cabeça globosa e piriforme, o acrossoma difuso, a peça intermediária dobrada na base e a cauda dobrada.

Na continuidade do trabalho, a dose de  $1,0 \times 10^9$  sptz foi descartada da avaliação *in vivo*, pois os resultados com uma maior redução do número de espermatozoides para  $1,0 \times 10^9$  sptz/dose tiveram uma influência negativa sobre a

sobrevivência espermática do sêmen suíno, com resultados incompatíveis para uso na inseminação artificial.

As taxas de parição foram iguais (93,3%) em todos os grupos, não havendo também diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre tratamentos, quanto às outras características avaliadas: número de leitões nascidos vivos e total de nascidos (Tabela 4).

Tabela 4. Resultados de fertilidade de fêmeas inseminadas com doses de sêmen de acordo com o número de espermatozoides/dose e o tipo de pipeta utilizada

Tratamento	N	Parto (%)	Total de nascidos	Nascidos vivos
Goldenpig $3,5 \times 10^9$ sptz/100 mL	30	93,3	$11,1 \pm 1,9^a$	$10,8 \pm 1,7^a$
Goldengilt $3,5 \times 10^9$ sptz/100 mL	30	93,3	$11,4 \pm 2,9^a$	$10,9 \pm 2,8^a$
Goldengilt $2,0 \times 10^9$ sptz/80 mL	30	93,3	$11,3 \pm 2,4^a$	$10,5 \pm 2,5^a$

<sup>a,b</sup>Letras diferentes, diferenças significativas entre valores na mesma coluna ( $p < 0,05$ ).

Na comparação dos resultados das DI com  $3,5 \times 10^9$  sptz, depositadas com as duas diferentes pipetas testadas (Goldenpig e Goldengilt), verificou-se que a taxa de parição, o número de leitões nascidos vivos e o total de nascidos não diferiram do grupo controle (Goldenpig  $3,5 \times 10^9$  sptz/100 mL), demonstrando que o tipo de pipeta usada nas inseminações não influenciou nos resultados de fertilidade.

Os resultados de fertilidade e prolificidade, no presente trabalho, não apresentaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre tratamentos, na taxa de parto e no tamanho de leitegada de fêmeas inseminadas, independentemente da DI utilizada. Os resultados de fertilidade indicaram que a diminuição do número de espermatozoides da DI para  $2 \times 10^9$  sptz foi possível com adequada fecundação e sem afetar negativamente a sobrevivência espermática e o desempenho reprodutivo das fêmeas.

A possibilidade de redução do volume da dose inseminante proporcionou uma economia de diluente, permitindo, dessa forma, a aquisição de soluções classificadas como de longa duração, que aumentam o período de estocagem do sêmen sem perda de qualidade. Por outro lado, a redução do número total de células/dose possibilitou um melhor manejo dos reprodutores, um aumento do número de doses/ejaculado, uma maior quantidade de fêmeas servidas por um só varrão e melhoria da relação custo x benefício.

## REFERÊNCIAS

ALTHOUSE, G.C.; WILSON, M.E.; KUSTERS, C.; PARSEY, M. Characterization of lower temperature storage limitations of fresh-extended porcine semen. **Theriogenology**, v.50, n.4, p.535-543, 1998. [ [Links](#) ].

ARAÚJO, A.A. **Mise au point d'un dilueur de conservation en milieu liquide pour la semence ovine en vue de l'insémination artificielle.** 2000. 81f. Tese (Doutorado em Ciências da Vida) - Université François de Tours, Tours, France. [ [Links](#) ].

BENNEMANN, P.E; BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I; CARDOSO, M.R.I. Motilidade espermática e integridade acrossomal em doses de sêmen suíno refrigerados e inoculados com *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. **Ciência Rural**, v.30, n.2, p.313-318, 2000. [ [Links](#) ].

BOE-HANSEN, G.; ERSBOILL, A.K.; GREVE, T.; CHRISTENSEN, P. Increasing storage time of extended boar semen reduces sperm DNA integrity. **Theriogenology**, v.63, n.7, p.2006-2019, 2005. [ [Links](#) ].

BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I. Inseminação artificial de suínos no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.21, p.13-15, 1997. [ [Links](#) ].

BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I.; DALLANORA, D. Situação atual da inseminação artificial em suínos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, n.1, p.17-32, 2005. [ [Links](#) ].

CEROLINI, S.; MALDJIAN, A.; SURAI, P.; NOBLER, R. Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar sêmen during liquid storage. **Animal Reproduction Science**, v.58, n.1-2, p.99-111, 2000. [ [Links](#) ].

DUBE, C.; BEAULIEU, M.; REYES-MORENO, C.; GUILLEMETTE, C.; BAILEY, J.L. Boar semen storage capacity of BTS and Androhep Plus: viability, motility, capacitation and tyrosine phosphorylation. **Theriogenology**, v.62, n.5, p.874-886, 2004. [ [Links](#) ].

HAUGAN; T, GROHN, Y.T; KOMMISRUDE, E; ROPSTAD, E.; REKSEN, O. Effects of sperm concentration at semen collection and storage period of frozen semen on dairy cow conception. **Animal Reproduction**, v.97, n.1-2, p.1-11, 2007. [ [Links](#) ].

HOU, L.J.; MA, X-H.; YANG, Z.M. Assessment of sperm viability mitochondrial activity, capacitation and acrossome intactness in extended boar semen during long-term storage. **Theriogenology**. v.58, n.7, p.1349-1360, 2002. [ [Links](#) ].

JOHNSON, L.A.; WEITZE, K.F.; FISER, P.; MAXWELL, W.M.C. Storage of boar semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, n.1-3, p.143-172, 2000. [ [Links](#) ].

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

MARTINEZ, E.A.; VAZQUEZ, J.M.; ROCA, J.; GIL, M.A.; DAY, B.N. Sucessful non-surgical deep intrauterine insemination with small numbers of spermatozoa in sow. **Reproduction**, v.122, p.289-296, 2001. [ [Links](#) ].

MARTINEZ, E.A.; VAZQUEZ, J.M.; ROCA, J.; GIL, M.A.; PARRILA, I.; VASQUEZ J.L.; DAY, B.N. Minimum number of spermatozoa required for normal fertility after deep intrauterine insemination in non-sedated sows. **Reproduction**, v.123, n.1, p.163-170, 2002. [ [Links](#) ].

MURGAS, L.D.S.; ZANGERONIMO, M.G.; SANTOS, A.G.O.; OLIVEIRA, S.L. Oxitocina no sêmen suíno heterospérmico resfriado a 15°C. **Ciência Animal Brasileira**, v.3, n.2, p.33-40, 2002. [ [Links](#) ].

STEVERINK, D.W.B.; SOEDE, N.M.; BOUWM, A.N.E.G.; KEM, P.B. Semen backflow after insemination and its effect on fertilizations in sows. **Animal Reproduction Science**, v.54, n.2, p.109-119, 1998. [ [Links](#) ].

STATISTICAL ANALYSES SOFTWARE - SYSTAT. Version 7.0. Chicago: SPSS INC, 1997. [ [Links](#) ].

TONIOLLI, R. **Pouvoir fécondant des spermatozoïdes de verrat: amélioration des conditions de conservation**. 1996. 91f. Tese de Doctorat (Doutorado em Ciência da Vida) - Université François Rabelais de Tours, Tours, France. [ [Links](#) ].

TEJERINA, F.; BURANAARRINUAY, K.; SARAVIA, F.; WALLGREN, M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ-H. Assessment of motility of ejaculated, liquid-stored boar spermatozoa using computerized instruments. **Theriogenology**, v.69, n.9, p.1129-1138, 2008. [ [Links](#) ].

SILVA FILHO, O.L.; PIMENTA FILHO, E.C.; SOUZA, J.F.; OLIVEIRA, Â.S.; OLIVEIRA, R.J.F.; MELO, M.; MELO, L.M.; ARAÚJO, K.Â.O.; SERENO, J.R.B. Caracterização do sistema de produção de suínos locais na microrregião do Curimataú Paraibano. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.9, n.1, p.7-17, 2008. [ [Links](#) ].

WATSON, P.F.; BEHAN, J.R. Intrauterine insemination of sows with reduced sperm number: results of a commercially based field trial. **Theriogenology**, v.57, n.6, p.1683-1693, 2002. [ [Links](#) ].

WATHERHOUSE, K.E.; DE ANGELIS, P.M.; HAUGAN, T.; PAULENZ, H.; HOFMO, P.O.; FARSTAD, W. Effects of *in vitro* storage time and semen-extender on membrane quality of boar sperm assessed by flow cytometry. **Theriogenology**, v.62, n.9, p.1638-1651, 2004. [ [Links](#) ].

Data de recebimento:  
Data de aprovação: