

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

**INFLUÊNCIA DO NÚMERO DE ESPERMATOZÓIDES NA DOSE E DO REFLUXO  
PÓS-INSEMINAÇÃO SOBRE O DESEMPENHO REPRODUTIVO DE FÊMEAS  
SUÍNAS INSEMINADAS INTRAUTERINAMENTE.**

ALISSON MEZALIRA

PORTO ALEGRE

2004

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

**INFLUÊNCIA DO NÚMERO DE ESPERMATOZÓIDES NA DOSE E DO  
REFLUXO PÓS-INSEMINAÇÃO SOBRE O DESEMPENHO REPRODUTIVO DE  
FÊMEAS SUÍNAS INSEMINADAS INTRAUTERINAMENTE.**

**Autor:** Alisson Mezalira

Dissertação apresentada como requisito  
parcial para obtenção do grau de Mestre  
em Ciências Veterinárias na área de  
Fisiopatologia da Reprodução Animal

**Orientador:** Dr. Fernando Pandolfo  
Bortolozzo.

PORTO ALEGRE

2004

**Alisson Mezalira**

**INFLUÊNCIA DO NÚMERO DE ESPERMATOZÓIDES NA DOSE E DO REFLUXO  
PÓS-INSEMINAÇÃO SOBRE O DESEMPENHO REPRODUTIVO DE FÊMEAS  
SUÍNAS INSEMINADAS INTRAUTERINAMENTE.**

Aprovada em 18 de março de 2004

APROVADO POR:

---

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

---

Prof. Dr. Corália Medeiros  
Membro da Comissão

---

Prof. Dr. David Emilio S. N. de Barcellos  
Membro da Comissão

---

Prof. Dr. Fabiane Mendonça Ferreira  
Membro da Comissão

## AGRADECIMENTOS

À Deus pela saúde e força.

Aos meus pais Diosene (*in memoriam*) e Salete, meus irmãos Tadeu, Rejane e Patrick pelo incentivo, apoio e carinho principalmente nos momentos difíceis da minha formação.

Aos meus tios e padrinhos Crusvaldino e Maria Assunta, meu primo João Angelo pela torcida e carinho.

Ao professor Fernando Pandolfo Bortolozzo pela orientação, colaboração e sugestões.

Aos professores Ivo Wentz e Mari Lourdes Bernardi pela co-orientação, ensinamentos, correções, amizade e colaboração.

Ao professor David Emilio Santos Neves de Barcellos pelos ensinamentos e amizade.

À Djane Dallanora, pelo empenho na realização deste trabalho, amizade, companheirismo e pela pessoa sensacional que és.

Aos amigos e colegas do Setor de Suínos da Faculdade de Veterinária da UFRGS, Ana Ondina, Anamaria, Carlos, Cezar, Eduardo Wollmann, Evandro Poleze, Fabiane Gentilini, Giancarlo, Goreti, Gustavo, Lia, Luís Eduardo Razia, Luis Eduardo da Silva, Paulo, Rafael, Ricardo e Vladimir pela amizade e coleguismo durante nossa convivência.

Aos estagiários, bolsistas e futuros colegas do Setor de Suínos da UFRGS pelo carinho, amizade e em especial ao Alisson Carlos Tedesco Schmidt pelo auxílio e empenho na realização do experimento.

À SADIA/SA unidade de Uberlândia em nome de Leocir Antônio Macagnan e Rodrigo Zilli, pela oportunidade e confiança no desenvolvimento deste trabalho em suas instalações. A todos os funcionários que colaboraram direta e indiretamente na execução deste trabalho.

À Minitub do Brasil pelo fornecimento dos materiais para o experimento.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

À UFRGS.

À vida, pois sem ela nada disso seria possível.

## RESUMO

### **INFLUÊNCIA DO NÚMERO DE ESPERMATOZÓIDES NA DOSE E DO REFLUXO PÓS-INSEMINAÇÃO SOBRE O DESEMPENHO REPRODUTIVO DE FÊMEAS SUÍNAS INSEMINADAS INTRAUTERINAMENTE.**

Autor: Alisson Mezalira

Orientador: Prof. Dr. Fernando Pandolfo Bortolozzo

Co-orientadores: Prof. Dr. Ivo Wentz

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mari Lourdes Bernardi

O presente trabalho objetivou avaliar o efeito do número de espermatozóides na dose inseminante sobre a taxa de prenhez (TPr) e no número de embriões de fêmeas suínas inseminadas pela técnica intra-uterina (IAU), em uma única inseminação (IA), efetuada no intervalo de até 24 horas antes da ovulação, considerando o refluxo de sêmen pós-inseminação. Foram utilizadas 211 fêmeas pluríparas híbridas (Landrace x Large White), com ordem de parto variando de dois a nove e intervalo desmame-estro de dois a seis dias. O diagnóstico de estro foi realizado duas vezes ao dia. Foram utilizadas doses com volume total de 20 ml contendo  $0,25 \times 10^9$  (tratamento 1),  $0,5 \times 10^9$  (tratamento 2) ou  $1,0 \times 10^9$  (tratamento 3) espermatozóides diluídos em Beltsville Thawing Solution (BTS) produzidas em “split sample”. Quatro machos híbridos (Landrace x Large White x Pietrain) foram utilizados como doadores de sêmen. Foi acompanhada a motilidade (MOT) de uma dose de 100 ml contendo  $2,5 \times 10^9$  espermatozóides proveniente de cada coleta de sêmen com a finalidade de avaliar a viabilidade espermática durante as 240 horas de armazenamento a 17°C. A coleta do refluxo vulvar, até 60 minutos após a IAU foi realizada com bolsas de colostomia descartáveis fixadas na região peri-vulvar. A determinação do número de espermatozóides contidos no refluxo foi realizada em câmara hemocitométrica. O diagnóstico de gestação foi realizado aos 20-23 dias com auxílio da ultra-sonografia transcutânea em tempo real. As fêmeas prenhes foram abatidas 34-41 dias após a IAU, onde foram coletados o útero e os ovários para contagem dos corpos lúteos e embriões. A passagem do cateter foi possível em todas as fêmeas. Não houve refluxo no momento da realização da IAU. Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) no percentual de volume (pvol) e de espermatozóides (psptz) refluídos até 60 minutos após a IAU entre os três tratamentos. O baixo (inferior a 15%) ou alto (superior a 15%) psptz refluídos não influenciou a TPr, mas houve correlação negativa ( $P = 0,0003$ ;  $R = -0,34$ ) do psptz refluídos com o número de embriões totais (NET). Não houve refluxo em apenas oito fêmeas e a amplitude do pvol variou de 0-136%. No presente trabalho, a MOT das doses inseminantes foi semelhante entre os quatro machos ( $P > 0,05$ ). A TPr não diferiu entre os tratamentos ( $P = 0,36$ ) porém foram verificadas diferenças ( $P < 0,05$ ) entre os machos dentro de cada tratamento. A redução na taxa de prenhez foi mais acentuada para o macho D, quando foram utilizadas doses com menor número de espermatozóides. Não houve efeito do macho ou da interação macho com tratamento sobre o número de embriões ( $P > 0,05$ ). O NET e viáveis diferiu entre o T1 e T2 ( $P < 0,05$ ). Utilizando-se apenas uma única inseminação intra-uterina no intervalo de até 24 horas antes da ovulação com  $0,5 \times 10^9$  espermatozóides, é possível alcançar índices superiores a 85% de prenhez e 14 embriões, aos 34-41 dias de gestação.

**Palavras-chave:** inseminação intra-uterina, desempenho reprodutivo, número de espermatozóides, dose inseminante.

## ABSTRACT

### ***Influence of sperm cell dose and post-insemination backflow on reproductive performance of intrauterine inseminated sows***

*Author: Alisson Mezalira*

*Advisor: Prof. Dr. Fernando Pandolfo Bortolozzo*

*Co-advisors: Prof. Dr. Ivo Wentz*

*Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Mari Lourdes Bernardi*

*The objective of the study was to evaluate the effects of the sperm cell dose, regarding to backflow post-insemination, on the pregnancy rate (PR) and total embryos in sows inseminated by the intrauterine technique (IUI) with one insemination performed in an interval of up to 24 hours before ovulation. It was utilized 211 multiparous hybrid females (Landrace x Large White) with parity varying from two to nine and weaning to oestrus interval of two to six days. The oestrus detection was performed twice daily. Inseminating doses with 20 ml of volume containing  $0.25 \times 10^9$  (treatment 1-T1),  $0.5 \times 10^9$  (treatment 2-T2) or  $1.0 \times 10^9$  (treatment 3-T3) spermatozoa diluted in Beltsville Thawing Solution (BTS) were utilized. The semen doses used were produced in split sample. Four hybrid boars (Landrace x Large White x Pietrain) were utilized as semen donors. The motility (MOT) of a dose with 100 ml of volume containing  $2.5 \times 10^9$  spermatozoa from every semen collection was analyzed to evaluate the spermatic viability during 240 hours of storage at 17°C. The collection of semen backflow up to 60 minutes after the IUI was performed with colostomy disposable bags fixed in the vulvar region. The determination of the sperm cell number in the backflow was carried out in a hemocitometric chamber. The gestation diagnosis was carried out 20-23 days after insemination with aid of real time transcutaneous ultrasonography. The pregnant females were slaughtered 34-41 days after the IUI and uterus and ovaries were collected to count corpus luteum and total embryos. The catheter insertion was possible in all females. It was not observed semen backflow at the moment of the IUI. There was not difference ( $P > 0.05$ ) in the percentages of volume (pvol) and spermatozoa backflow (psptz) up to 60 minutes after IUI between the three treatments. The low (inferior to 15%) or high (superior to 15%) psptz in the backflow did not influence the pregnancy rate (PR), but it showed a negative correlation ( $P = 0.0003$ ;  $R = -0.34$ ) between psptz in the backflow and total embryos number (NET). It was not observed semen backflow in only eight females and the pvol amplitude varied from 0 to 136%. The motility during ten days storage at 17°C was similar among boars ( $P > 0.05$ ). There was not difference in the PR between the treatments ( $P = 0.36$ ), however, it was verified differences ( $P < 0.05$ ) among boars inside of each treatment. The PR reduction was more accentuated for boar "D", when doses with lesser number of spermatozoa were used. It was not observed boar effect or boar-treatment interaction with total embryos number ( $P > 0.05$ ). The NET and viable embryos number differed between T1 and T2 ( $P < 0.05$ ). Using one intrauterine insemination in the interval of up to 24 hours before ovulation with a dose containing  $0.5 \times 10^9$  spermatozoa, it is possible to reach pregnancy rates superior to 85% and a total of 14 embryos with 34-41 days of the gestation period.*

**Keywords:** *intrauterine insemination, reproductive performance, spermatozoa number, inseminating dose.*

## LISTA DE TABELAS

### Tabelas inseridas no Artigo Científico

TABELA 1-	Percentage of volume and spermatozoa in the backflow and effect of low (inferior to 15%) or high (superior to 15%) spermatozoa losses on the pregnancy rate and number of total embryos in swine females with a single intrauterine insemination.....	33
TABELA 2-	Pregnancy rate (PR) according to the male utilized in the intrauterine insemination of swine females.....	33
TABELA 3-	Sperm motility of the males utilized as donors to intrauterine insemination.....	34
TABELA 4 -	Reproductive performance of swine females submitted to a single intrauterine insemination (LSmeans $\pm$ standard deviation).....	34

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Equipamento utilizado para inseminação intra-uterina em suínos.....	14
--	----



## LISTA DE ABREVIATURAS

BTS	<i>Beltsville Thawing Solution</i>
cm	Centímetro
DI(s)	Dose(s) inseminante(s)
DLAC	Duração da lactação
eCG	Gonadotrofina coriônica equina
ECV	Escore corporal visual
h	Horas
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
IA(s)	Inseminação(ões) artificial(ais)
IAT	Inseminação artificial tradicional
IAU	Inseminação artificial intra-uterina
IUI	<i>Intrauterine insemination</i>
m	Metro
ml	Mililitros
MOT	Motilidade
mm	Milímetros
NET	Número de embriões totais
OP	Ordem de parto
PMSG	<i>Pregnant Mare Serum Gonadotrophin</i>
PR	<i>Pregnancy rate</i>
psptz	Percentual de espermatozóides
pvol	Percentual de volume
TAI	<i>Traditional insemination</i>
TPr	Taxa de prenhez
XTL	Média do número de leitões nascidos totais nos partos anteriores
°C	Graus Celsius

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>13</b>
2.1 Deposição intra-uterina do sêmen.....	13
2.1.1 Inseminação intra-uterina cirúrgica.....	14
2.1.2 Inseminação intra-uterina em condições de campo.....	15
2.1.3 Inseminação intra-uterina.....	16
2.1.4 Inseminação intra-uterina profunda.....	17
2.2 Refluxo pós-inseminação.....	19
2.3 Efeito do doador de sêmen.....	21
<b>3 ARTIGO CIENTÍFICO.....</b>	<b>23</b>
<b>4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>38</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>40</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>43</b>
Apêndice A - Seleção das fêmeas.....	43

## 1 INTRODUÇÃO

A utilização da inseminação artificial (IA) em suínos tem aumentado de forma marcante nos últimos anos. No Brasil, no início da década de 90, o número de IAs era de 90.000 (SCHEID, 1991). Já para o ano de 2000, as estimativas foram de 1.666.000 primeiras IAs, correspondendo a 51% do plantel tecnificado e 27% do total de matrizes do país (WENTZ *et al.*, 2000).

O uso desta técnica proporcionou a melhora na conversão alimentar, no ganho de peso, na qualidade de carcaça, além de possibilitar o melhor aproveitamento de machos geneticamente superiores e redução nos custos de produção.

Estudos realizados no final da década de 50 (HANCOCK, 1959) e reiniciados nestes últimos anos (VAZQUEZ *et al.*, 2000; MARTINEZ *et al.*, 2001), têm proposto alterações na deposição da dose inseminante. Na inseminação tradicional (IAT), o sêmen é depositado na cérvix, enquanto que a nova técnica, a inseminação intra-uterina (IAU), preconiza a deposição no corpo ou cornos uterinos.

Esta técnica utiliza uma pipeta tradicional e um cateter flexível que possibilita a deposição da dose diretamente no corpo ou em um dos cornos uterinos aproximadamente 20 cm além da cérvix. Mais recentemente, um novo equipamento tem sido apresentado, o qual dispensa o uso de uma pipeta como guia e é composto somente de um cateter flexível (ECHEGARRAY, 2003).

A deposição dos espermatozóides no corpo ou no corno uterino permite a utilização de doses inseminantes com menor volume e número de espermatozóides. Com isso, estudos foram realizados, concomitantemente ao desenvolvimento de pipetas de IAU, no intuito de estabelecer o limite máximo dessa redução, sem comprometimento do desempenho reprodutivo (WATSON, BEHAN, 2002; WOLKEN *et al.*, 2002; DALLANORA *et al.*, 2003b).

Muitos trabalhos já foram realizados, porém o número de espermatozóides e volume de diluente necessários (MARTINEZ *et al.*, 2002; WOLKEN *et al.*, 2002) e o intervalo ideal para realizar a IA em relação à ovulação (WOLKEN, 2001; BENNEMANN *et al.*, 2003) ainda precisam ser melhor estudados.

Os objetivos do presente trabalho foram avaliar o efeito do número de espermatozóides da dose inseminante e do doador de sêmen, considerando o refluxo de sêmen pós-inseminação, sobre a taxa de prenhez e o número de embriões em fêmeas suínas

inseminadas pela técnica intra-uterina, em uma única inseminação, efetuada no intervalo de até 24 horas antes da ovulação.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Deposição intra-uterina do sêmen

Desde o final dos anos 50 (HANCOCK, 1959), existiam evidências de que a deposição dos espermatozóides no útero permitiria a redução do número de células espermáticas e do volume da dose inseminante. O principal benefício da IAU seria, então, a redução da perda espermática durante e após a realização da IA (HANCOCK, 1959).

Mathias (2003) classificou a deposição dos espermatozóides diretamente no útero em IA intra-uterina, quando as células são depositadas no corpo do útero ou no terço inicial dos cornos uterinos e intra-uterina profunda, quando as células são depositadas no terço final dos cornos uterinos, próximo à junção útero-tubárica.

Para proporcionar a deposição da dose próximo ao local da fecundação, inicialmente foram utilizadas técnicas de deposição cirúrgica (KRUEGER *et al.*, 1999), com a fêmea sob anestesia, método que inviabiliza a utilização em condições de campo e em grande escala. Mais recentemente, têm sido utilizados instrumentos que permitem alcançar o corpo e os cornos uterinos sem a necessidade de sedação da fêmea (VAZQUEZ *et al.*, 2000). Os instrumentos utilizados são endoscópios, sondas ou pipetas de inseminação que ultrapassam a cérvix e alcançam o ambiente uterino com a utilização de cateteres internos a esses (MARTINEZ *et al.*, 2002; WATSON, BEHAN, 2002; WOLKEN *et al.*, 2002).

Hancock (1959) utilizou uma sonda (Figura 1) de 35 cm fixada à cérvix e, internamente a esta, um cateter de 52 cm, que permitiu depositar o sêmen na vagina, na cérvix ou no útero (Grupo A). Um grupo controle foi submetido à inseminação intracervical (Grupo B) e um terceiro grupo foi submetido à monta natural (Grupo C).

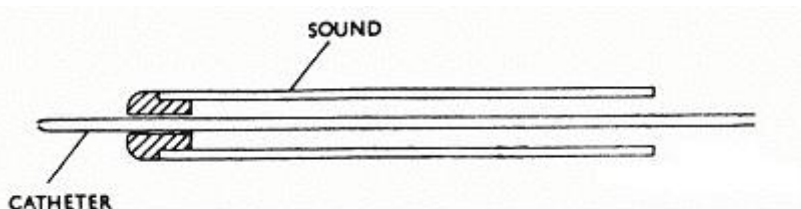


Figura 1: Equipamento utilizado para inseminação intra-uterina em suínos (HANCOCK, 1959), composto de uma sonda fixada à cérvix (“sound”) e de um cateter (“catheter”).

As fêmeas foram inseminadas com 100 ml de sêmen não diluído, no dia da entrada em estro ou 24 horas após. As fêmeas foram abatidas 24 a 72 horas após a IA e contados os embriões e espermatozóides acessórios. A taxa de prenhez foi de 76,5, 83,3 e 100% e o

percentual de oócitos fecundados 64,6, 59,2 e 95,9% para os grupos A, B e C, respectivamente. Dentro do grupo A, as variações na taxa de prenhez foram influenciadas pelo local de deposição da dose, sendo 96,3%, 50% e 57,1% para as deposições uterina, cervical e vaginal, respectivamente. O número de espermatozóides encontrados na zona pelúcida foi semelhante entre as fêmeas do grupo A, com deposição uterina, e aquelas do grupo C.

Hancock e Hovell (1961), empregando a tecnologia descrita por Hancock (1959) para depositar a dose inseminante no útero, utilizaram doses com 10, 1 ou 0,1 bilhões de espermatozóides, objetivando avaliar a influência do volume da dose. No experimento A, 24 fêmeas foram inseminadas com as três diferentes doses em 20 ml e 24 fêmeas foram inseminadas da mesma forma, porém com a infusão adicional de 100 ml de diluente após a IA. No experimento B, foram utilizadas doses com 10 bilhões de espermatozóides e, no experimento C, doses com 1 bilhão de espermatozóides. As fêmeas foram abatidas 2 a 4 dias após a IA para contagem de embriões (experimento A) ou 25 dias (experimentos B e C). No experimento A, o percentual de oócitos clivados foi menor para as fêmeas inseminadas com infusão adicional de diluente (36,4 vs. 59,4%;  $P < 0,05$ ). Houve, também, influência do número de espermatozóides na dose sobre esse parâmetro ( $P < 0,01$ ), sendo a taxa de clivagem de 78,5 e 41,5% (10 bilhões), 83,5 e 44,2% (1 bilhão) e 24,6 e 24,6% (0,1 bilhão) para o grupo com 20 ml ou com diluente adicional, respectivamente. Nos experimentos B e C, o aumento do número de espermatozóides de 1 para 10 bilhões, não representou aumento na taxa de prenhez, demonstrando a possibilidade de redução do número de espermatozóides na dose inseminante com a deposição intra-uterina.

### **2.1.1 Inseminação intra-uterina cirúrgica:**

Krueger *et al.* (1999) realizaram dois experimentos para avaliar os resultados obtidos em IAs com reduzido número de espermatozóides. No experimento 1, 109 leitoas tiveram o estro sincronizado pela aplicação de PMSG e hCG e foram divididas em 5 grupos, que foram inseminados cirurgicamente com doses de 1, 5, 100 ou 500 milhões de espermatozóides móveis por corno uterino, diluídos em 0,5 ml. As IAs foram realizadas em três momentos: 32, 38 horas após a aplicação do hCG ou imediatamente após a ovulação (determinada por ultrassonografia), sendo as doses inseminantes depositadas, em ambos os cornos uterinos, próximo à junção útero-tubárica. As fêmeas inseminadas com 1 milhão de espermatozóides tiveram menores taxas de prenhez (35,7% e 40,0%) e de parto (35,7% e 20,0), quando a IA foi

realizada 32 e 38 horas após a aplicação de hCG respectivamente, em relação às demais doses inseminantes ( $P < 0,05$ ), não existindo essa diferença nas fêmeas inseminadas após a ovulação. Não existiu efeito da dose inseminante sobre o tamanho da leitegada ( $P > 0,05$ ). No experimento 2, 34 leitoadas foram inseminadas 32 horas após a aplicação do hCG, de forma cirúrgica, como descrito anteriormente, e nove leitoadas foram inseminadas de forma tradicional, uma única vez, com 1 bilhão de espermatozoides em 100 ml. Todas as fêmeas foram abatidas 48 horas após a realização da inseminação cirúrgica ou tradicional, procedendo-se à lavagem dos ovidutos e cornos uterinos para coleta de embriões. Mais uma vez, a taxa de fecundação foi menor somente nas fêmeas inseminadas com 1 milhão de espermatozoides por corno uterino ( $P < 0,001$ ).

Wolken (2001) realizou IAU cirúrgica e não-cirúrgica em leitoadas e porcas, respectivamente. Na primeira parte do experimento, foram inseminadas 46 leitoadas, por via cirúrgica, 32 horas após o tratamento com hCG (16 por laparoscopia e 30 por laparotomia). Foram utilizados três machos para a preparação das doses com 10, 50 ou 100 milhões de espermatozoides diluídos em 0,5 e 10 ml, além de um grupo controle de 100 milhões em 50 ml. Essas doses foram depositadas próximo à bifurcação (corpo do útero e cornos uterinos). Os animais foram abatidos 48 horas após a IA para contagem de embriões e não foram observadas diferenças nas taxas de fecundação entre as diferentes doses. Na segunda parte do experimento, 18 leitoadas tiveram o estro induzido hormonalmente e foram inseminadas com doses de 100 milhões em 20 ml, introduzidos em apenas um corno uterino, 50 milhões em 10 ml, em ambos os cornos uterinos, e 100 milhões em 20 ml, depositados cirurgicamente no corpo uterino. Não existiram diferenças nas taxas de fecundação ao abate, 48 horas após a IA, entre os diferentes locais de deposição, volumes e números de espermatozoides utilizados.

### **2.1.2 Inseminação intra-uterina em condições de campo**

Watson e Behan (2002) utilizaram a IAT e IAU não cirúrgica com doses de 1, 2 e 3 bilhões de espermatozoides diluídos em 80 ml de diluente em delineamento fatorial 2x3. Os 3240 animais utilizados foram selecionados para ordem de parto de 2 a 11 (sendo a maioria menor que 9) e intervalo desmama-estro de 4 a 6 dias. As fêmeas foram inseminadas na hora 0 (no dia em que o estro foi diagnosticado) e 24 horas após a primeira dose. O instrumento utilizado para IAU consistia de uma pipeta convencional de IA com um cateter interno, o qual avança 20 cm além da extremidade da pipeta. Não existiram diferenças na taxa de parto ( $n=3201$ ) entre as doses com 1 (86,9%), 2 (92,5%) e 3 (90,5%) bilhões com IAU e 2 (91,8%)

e 3 (91,1%) bilhões com IAT ( $P>0,05$ ). Somente a IAT com 1 (65,8%) bilhão apresentou taxa de parto significativamente menor às dos outros tratamentos ( $P<0,001$ ). Não houve diferença no tamanho da leitegada entre as doses com IAT com 2 e 3 bilhões e todos os grupos de IAU ( $P>0,05$ ). Na IAT, o tamanho de leitegada foi significativamente menor ( $P<0,001$ ) nas fêmeas inseminadas com 1 bilhão (10,3) em comparação àquelas com 3 bilhões de espermatozóides (12,5).

Dallanora *et al.* (2003b) compararam a IAT e IAU, utilizando 608 fêmeas desmamadas, distribuídas em dois tratamentos. Foram utilizadas fêmeas com duração da lactação de 15 a 19 dias, intervalo desmame-estro de 2 a 6 dias e ordem de parto variando de 2 a 4. As doses inseminantes continham 3 bilhões ou 1,5 bilhões espermatozóides e volume total de 90 ou 60 ml, para a IAT e IAU, respectivamente. O número médio de inseminações por estro foi de 3,3 ( $P>0,05$ ) nos dois tratamentos. No grupo IAU, foi possível a passagem do cateter através da cérvix em 97,4% das fêmeas (304/312). Os autores observaram presença de sangue no cateter em pelo menos uma das inseminações em 9,5% das fêmeas. O retorno ao estro das fêmeas que apresentaram sangue na IA (4/29; 13,8%) foi maior ( $P=0,002$ ) que o observado nas fêmeas que não tiveram sangue (7/275; 2,5%). O diagnóstico de gestação foi realizado com auxílio da ultra-sonografia em tempo real, do 20º ao 23º dia após a IA. Foram avaliadas as taxas de retornos ao estro, de prenhez e de parto, as quais não diferiram entre os tratamentos ( $P>0,05$ ). A taxa de prenhez foi de 99,5 e 97,2 e o número de leitões nascidos totais de  $11,6 \pm 2,6$  e  $11,8 \pm 2,8$ , para a IAU e IAT, respectivamente. A taxa de parto foi de 92,8 e 93,4 para a IAU e IAT, respectivamente.

### **2.1.3 Inseminação intra-uterina**

Wolken (2001) utilizou uma única IAU não-cirúrgica, com doses de 500 e 100 milhões em 20 ml e de 100 milhões em 10 ml, em fêmeas pluríparas. As fêmeas foram inseminadas 24-32 horas após o início do estro. As fêmeas com prenhez positiva foram abatidas entre os dias 28 e 35 após a IA. Não foram constatadas diferenças na taxa de prenhez e no número de embriões viáveis entre os grupos.

Bennemann *et al.* (2003) inseminaram uma única vez, pela técnica intra-uterina, 57 fêmeas de ordem de parto 3 a 9 e intervalo desmame-estro de 2 a 6 dias. Foram utilizadas doses inseminantes de 1 e 2 bilhões em 60 ml, em intervalos pré-ovulatórios de 0 a 24 horas ou 25 a 36 horas. As fêmeas prenhes foram abatidas 24 a 39 dias após a IAU. Não houve



interação entre o número de espermatozóides (1 e 2 bilhões) e o intervalo inseminação-ovulação (0 a 24 e 25 a 36 horas). A taxa de prenhez (82,1% e 96,5%) e o número de embriões totais (16,3 e 14,7) para 1 e 2 bilhões, respectivamente, não foram influenciados pelo número de células espermáticas na dose ou pelo intervalo pré-ovulatório.

#### **2.1.4 Inseminação intra-uterina profunda**

Wolken (2001) inseminou 28 pluríparas sem indução hormonal pela técnica IAU, 24-32 horas após o início do estro, com 100 milhões de espermatozóides diluídos em volumes de 5, 10 e 50 ml. Não existiram diferenças na taxa de prenhez e tamanho das leitegadas entre os diferentes volumes das doses.

Utilizando técnica intra-uterina profunda com uma pipeta de IAT e um cateter flexível (1,8 m de comprimento e 4 mm de diâmetro), Martinez *et al.* (2002) inseminaram 423 fêmeas com ordem de parto variando de 2 a 6 e duração da lactação de 16 a 27 dias. Nesse trabalho também foi utilizado um grupo controle de fêmeas, não induzidas hormonalmente ao estro, e que foram inseminadas tradicionalmente com doses de 3 bilhões de espermatozóides em volume de 100 ml. As fêmeas inseminadas pela técnica intra-uterina profunda foram induzidas ao estro (com eCG e hCG) e inseminadas 36 horas após a aplicação do hCG, com doses de 10, 25, 50 ou 150 milhões em 5 ml, com infusão posterior de 5 ml de diluente. A prenhez foi diagnosticada aos 24-28 dias após a IA por ultra-sonografia transcutânea. As taxas de prenhez e de parição não foram diferentes entre as fêmeas inseminadas com 150 (86,3%) e 50 (77,8%) milhões, quando comparadas ao grupo controle IAT com 3 bilhões (86,4%), porém existiu diferença significativa ( $P < 0,001$ ) neste parâmetro, quando o número foi reduzido para 25 (51,7%) e 10 (39,1%) milhões. O número de espermatozóides não influenciou o número de nascidos totais que variou de  $9,0 \pm 0,4$  a  $9,8 \pm 0,2$  para 10 milhões e 3 bilhões, respectivamente.

Vazquez *et al.* (2002), utilizando a técnica de sexagem de espermatozóides por citometria de fluxo, produziram doses com 70 e 140 milhões submetidos ou não à sexagem. No experimento 1, fêmeas com ordem de parto 2 a 6 e duração média da lactação de 21 dias tiveram estro induzido com eCG + hCG, como descrito por Martinez *et al.* (2002), e foram inseminadas pela técnica intra-uterina profunda com pipeta e cateter flexível, 38 horas após a aplicação do hCG. Existiram diferenças nas taxas de prenhez e de parto entre as fêmeas inseminadas com doses submetidas à sexagem e aquelas não sexadas, independentemente do número de espermatozóides ( $P < 0,05$ ). No entanto, o tamanho das leitegadas não foi diferente

entre as doses, independentemente do número de espermatozóides e da sexagem ou não. No experimento 2, fêmeas com estro espontâneo, ordem de parto 2 a 6 e duração média da lactação de 21 dias foram submetidas à IAU profunda com doses iguais às do experimento 1. Somente foram inseminadas as fêmeas cujos ovários apresentassem múltiplos folículos maiores que 6 mm, após exame de ultra-sonografia transcutânea, em tempo real. Os resultados foram semelhantes aos do experimento 1, isto é, apenas houve diferença entre doses sexadas ou não ( $P < 0,05$ ), sem a influência do número de espermatozóides na dose sobre a taxa de prenhez, de parição e tamanho da leitegada.

Roca *et al.* (2003) avaliaram a fertilidade de fêmeas desmamadas usando a IAU profunda com sêmen congelado (motilidade média de 46 a 62% após o descongelamento) e sêmen fresco (4 a 6 horas após a coleta e diluição). As IAs foram realizadas com o auxílio de uma pipeta e um cateter flexível (1,8 m de comprimento e 1,8 mm de diâmetro interno). No primeiro experimento, as fêmeas tiveram o estro induzido com eCG e hCG. Uma única IA foi realizada 36 a 40 horas após a aplicação de hCG. Os autores compararam quatro tratamentos: 1 bilhão de espermatozóides (congelados)-IAU profunda ( $n=49$ ); 6 bilhões (congelados)-IAT ( $n=33$ ); 150 milhões (sêmen fresco)-IAU profunda ( $n=29$ ), e 3 bilhões (sêmen fresco)-IAT ( $n=52$ ), este último com IA 12 e 24 horas após o início do estro. Nos três primeiros tratamentos o volume da dose foi 5 ml. Os autores obtiveram taxa de prenhez de 79,6% e 82,8% utilizando a IAU profunda com 1 bilhão de espermatozóides congelados e 150 milhões de espermatozóides de sêmen fresco, respectivamente, e 78,8% com IAT e 6 bilhões de espermatozóides congelados. Não existiram diferenças nas taxas de prenhez, de parição e tamanho de leitegada entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ). No experimento 2, as fêmeas foram inseminadas 30 e 42 horas após o início do estro com doses de 1 bilhão de espermatozóides congelados com IAU profunda ( $n=40$ ) ou 150 milhões de espermatozóides (sêmen fresco) e IAU profunda ( $n=38$ ), ambos em 5 ml. Um terceiro grupo foi inseminado com 3 bilhões de espermatozóides (sêmen fresco) com IAT. As taxas de prenhez e de parição obtidas com sêmen fresco foram superiores àquelas obtidas com sêmen congelado ( $P < 0,05$ ), mas a mesma diferença não foi observada no número de leitões nascidos por leitegada ( $P > 0,05$ ). Segundo os autores, esses resultados preliminares indicam que a tecnologia de IAU profunda permite elevar os índices de fertilidade com sêmen congelado, utilizando doses com reduzido número de espermatozóides.

## 2.2 Refluxo pós-inseminação

Um grande volume de sêmen (300 ml na monta natural; 80 a 100 ml na IAT) com elevado número de espermatozóides (60 bilhões na monta natural e de 2 a 5 bilhões na IAT), é depositado diretamente no útero (GARNER, HAFEZ, 1993).

O refluxo, apesar de suas causas serem ainda pouco conhecidas (LEVIS *et al.*, 2002), pode ser o resultado de erros na técnica de IA e da falta de habilidade do inseminador. Langendijk *et al.* (2002) demonstraram grande variação na atividade de contratilidade do miométrio entre fêmeas durante o estro. Isso poderia explicar as variações na quantidade de refluxo entre fêmeas e entre IAs de uma mesma fêmea.

A dose inseminante é eliminada do útero nas primeiras horas após a IA (VIRING, EINARSSON, 1981). As perdas de espermatozóides durante a IAT e, posteriormente, durante a permanência desses no trato genital feminino, são promovidas basicamente por refluxo e fagocitose, além de aderência ao epitélio ciliado do endométrio e migração dentro das glândulas uterinas (RATH *et al.*, 2000). Viring e Einarsson (1981) concluíram que aproximadamente 1/3 dos espermatozóides infundidos são eliminados por refluxo em até 2 horas após a IAT e essas perdas de sêmen durante e após a IA podem interferir no transporte dos espermatozóides para o oviduto e diminuir o número de células disponíveis para a fecundação (STEVERINK *et al.*, 1998).

Baker *et al.* (1968) avaliaram perdas de sêmen de 110 leitoas no momento da IAT. No experimento 1, as IAs foram realizadas 6 horas antes do momento da ovulação e, no experimento 2, 8 horas antes da ovulação. Foram utilizados volumes de 20, 100 ou 200 ml e 1, 5 ou 10 bilhões de espermatozóides em delineamento fatorial 3x3. No experimento 1, os percentuais médios de perdas de volume foram de 20%, 22% e 48% e, no experimento 2, as perdas foram de 40%, 39% e 51% para os volumes de 20, 100 e 200 ml infundidos, respectivamente.

Steverink *et al.* (1998) avaliaram o refluxo de fêmeas suínas, inseminadas uma única vez pela técnica tradicional, com doses de 80 ml e 1 bilhão, 3 bilhões e 6 bilhões de espermatozóides, em três momentos: durante a IA (M1), durante os primeiros 30 minutos após o término da IA (M2) e a partir dos 30 até 150 minutos após o término da IA (M3). O percentual médio de volume coletado ao final de 150 minutos foi 70% (17-120%) do volume infundido e 25% (3-48%) do número de espermatozóides infundidos. Neste trabalho foi constatado que, em doses com 1 bilhão de espermatozóides, perdas espermáticas iguais ou superiores a 5% no momento da IA afetaram negativamente o percentual de embriões

normais. A porcentagem de espermatozóides refluídos não foi influenciada pelo número de espermatozóides da dose ( $P>0,05$ ) e o intervalo IA-ovulação não teve relação com o volume de refluxo, em nenhuma das três medidas ( $P>0,05$ ).

Flores (2001) coletou o refluxo de 604 fêmeas durante a realização da IAT (M1) e de 108 fêmeas até 120 minutos após cada IA (M2). As fêmeas foram distribuídas em três grupos e inseminadas pelo método “Auto-IA”, sem intervenção do funcionário; método intermediário, IAT com funcionário apenas sustentando a dose na posição vertical e método tradicional, ficando o tempo de infusão da dose atrelado à pressão realizada pelo inseminador. As fêmeas foram inseminadas três a quatro vezes durante o estro com doses de 100 ml e 4 bilhões de espermatozóides e foi observada grande variação, entre as fêmeas, no volume e número de células espermáticas no refluxo. No M1, o mais comum foi a ausência de refluxo, embora, em algumas fêmeas, tenha sido eliminado em média 65% e até 80% do volume original da dose. No M2, foi observada grande amplitude de volume refluído, independentemente do tratamento aplicado, sendo, em valores médios, perdas entre 65 e 73% do volume infundido. Para os dados de espermatozóides no refluxo, no M2, foi observado que o percentual de células refluídas estabeleceu-se entre 28 e 32% do número de células espermáticas infundidas inicialmente, com variação de 0 a 105%.

Dallanora *et al.* (2003a) avaliaram o refluxo de fêmeas inseminadas pela técnica intra-uterina (T1) e tradicional (T2), no momento das inseminações e até 2 horas. Nesse experimento foram utilizadas 64 fêmeas, com 3 a 4 IAs por estro. No T1 foram utilizadas doses inseminantes com 1,5 bilhão de espermatozóides, em 60 ml, e no T2, doses inseminantes com 3 bilhões em 90 ml. O percentual de volume (pvol) refluído foi de 75,4 (0-121,7%) e 62,7 (0-111,1%) para o T1 e T2, respectivamente ( $P<0,01$ ). O percentual de espermatozóides refluídos (psptz) foi de 22,7 (0-85,7%) e 23,0 (0-62,7%) para o T1 e T2, respectivamente. Nesse trabalho não houve correlação entre o psptz e o número de leitões nascidos totais.

### **2.3 O efeito do doador de sêmen**

Com a utilização da IA em suínos e o conseqüente aumento no número de fêmeas inseminadas por ejaculado, o impacto da fertilidade de um único animal sobre o desempenho reprodutivo do plantel é maior e o uso da IAU exacerba ainda mais esse efeito.

A avaliação de um reprodutor exige a combinação de exames clínicos e laboratoriais. A análise seminal *in vitro* (motilidade e morfologia espermática) complementa o exame

clínico e tem grande importância na avaliação (indireta) da função testicular, epididimária e do trato genital, permitindo eliminar machos que apresentam infertilidade ou fatores predisponentes à sub-fertilidade. Isso permite avaliar o grau de normalidade do sêmen antes que este seja processado na central de inseminação artificial. (RODRIGUEZ-MARTINEZ, ERIKSSON, 2000; RODRIGUEZ-MARTINEZ, WALLGREN, 2000).

Xu *et al.* (1998) avaliaram a fertilidade do sêmen de seis machos. Foram avaliadas a morfologia e a motilidade espermática nos dias 0, 1, 4 e 8 pós-diluição. Não houve diferença ( $P>0,05$ ) na motilidade nos diferentes dias avaliados dentro de cada macho. Entre os machos, houve diferença no percentual de células morfologicamente normais e na motilidade ( $P<0,05$ ), porém não existiram diferenças na taxa de parto e tamanho de leitegada das fêmeas inseminadas tradicionalmente, 3 vezes em 2 dias, com doses de 2 e 3 bilhões espermatozóides em 100 ml. Quando foi reduzido o número de espermatozóides da dose de 3 para 2 bilhões de espermatozóides não foi observado efeito na taxa de parto, porém ocorreu uma redução no tamanho da leitegada ( $P<0,05$ ).

Foxcroft (2002) utilizou doses inseminantes de 1,5 bilhão de espermatozóides de nove machos para IAT de grupos de aproximadamente 60 leitoas. A análise laboratorial rotineira do ejaculado indicou índices de motilidade superiores a 70% e menos de 15% de espermatozóides morfologicamente anormais no ejaculado *in natura*. Este autor acompanhou a motilidade das doses armazenadas a 17°C por um período de 10 dias, a qual variou de 43 a 62% entre os machos, no final do período. As taxas de prenhez das fêmeas inseminadas pelos diferentes machos variaram de 66% a 98%, a taxa de parição variou de 65% a 97% e o número de nascidos totais, de 8,5 a 12 leitões. O grupo de fêmeas inseminadas pelo macho cujas doses apresentaram motilidade inferior no décimo dia, apresentou menor taxa de parição ( $P<0,05$ ), existindo, aparentemente, uma relação entre motilidade do sêmen durante o armazenamento e fertilidade desse macho.

Popwell e Flowers (2003) utilizaram três machos oriundos do cruzamento Landrace x Large White x Duroc x Hampshire. Foram utilizados 30 ml da fase rica do ejaculado coletado uma vez por semana durante 40 semanas. Durante as semanas ímpares (1, 3, ...39) o sêmen foi avaliado para as seguintes características: porcentagem de células espermáticas com motilidade progressiva, alterações morfológicas de cauda, cabeça e acrossoma e o percentual de espermatozóides com atividade de acrosina. Nas semanas pares (2, 4, ... , 40), cada ejaculado foi avaliado e diluído em BTS para ser utilizado na IA. Foram inseminadas tradicionalmente fêmeas com doses inseminantes de 3 bilhões em 80 ml. As fêmeas (pelo menos 10 por ejaculado por semana) foram inseminadas em intervalos de 24 horas, a partir do

primeiro dia do estro e até o final do estro. Não houve diferença ( $P>0,05$ ) entre os três machos para o percentual de motilidade, morfologia de acrossoma, cabeça e cauda. Porém, para a atividade da acrosina, o macho 4291 foi inferior comparado aos machos 2901 e 3495. Foram encontradas taxas de parto similares ( $P>0,05$ ) nas fêmeas inseminadas com os machos 3495 e 2901, sendo que as fêmeas inseminadas pelo macho 4291 apresentaram menor taxa de parto ( $P<0,05$ ). Para o número de leitões nascidos, o macho 3495 foi significativamente superior ( $P<0,05$ ) comparado aos machos 2901 e 4291. Os autores concluíram que os testes para avaliação *in vitro* utilizados no trabalho não permitem estimar a fertilidade *in vivo* e, conseqüentemente, não possibilitam a identificação de machos sub-férteis.

Os resultados desses trabalhos indicam que não existe uma relação confiável entre os dados de motilidade durante o armazenamento e morfologia do sêmen com os dados de fertilidade *in vivo*. Outro dado apresentado é que a redução do número de espermatozoides por dose pode evidenciar machos com baixa fertilidade que passariam despercebidos quando doses tradicionais são utilizadas.

3 ARTIGO A SER APRESENTADO À COMISSÃO EDITORIAL DA  
REVISTA “REPRODUCTION IN DOMESTIC ANIMALS”\*

---

\* A formatação do artigo segue as normas da revista *Reproduction in Domestic Animals*

Faculdade de Veterinária - Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Porto Alegre, Brazil.

**Influence of sperm cell dose and post-insemination backflow on reproductive performance of intrauterine inseminated sows**

**Authors:** A Mezalira, D Dallanora, ML Bernardi, I Wentz, FP Bortolozzo.

**Abridged title:** Intrauterine insemination in sows

**Contents:**

This study was carried out to evaluate the effects of the sperm cell dose and of the semen backflow on the pregnancy rate and number of embryos of sows inseminated once at 0-24 h before ovulation with intrauterine technique. The results were analysed from a total of 211 sows assigned into three groups and inseminated with doses of  $0.25 \times 10^9$  (T1),  $0.5 \times 10^9$  (T2) and  $1.0 \times 10^9$  (T3) spermatozoa. Semen backflow was observed in 95% of females (143/151) evaluated for this purpose. The percentage of semen backflow is close to 2/3 of the volume and the percentage of sperm is around 15% of the infused sperm dose. With 0.5 billion of spermatozoa it is possible to reach a pregnancy rate superior to 85% and a total of 14 embryos at 34-41 days of gestation.

**Introduction**

It has been previously suggested that semen deposition into the uterine horn provided higher fertility in swine, when compared to vaginal or cervical insemination (Hancock 1959). This author showed that intrauterine insemination could permit a considerable reduction in the number of spermatozoa and volume of inseminating dose.

With the development of special devices (Vazquez et al. 2000) that allow the cervix to be penetrated easily it has been shown that sperm dose can be deposited into the uterine horn of pluriparous females, ensuring similar fertility to that obtained with traditional insemination (Watson and Behan, 2002; Wolken et al. 2002; Dallanora et al. 2003). However,



questions concerning the minimum number of spermatozoa and extender volume necessary (Martinez et al. 2002; Wolken et al. 2002) and the optimal interval insemination-ovulation (Bennemann et al. 2003) still remain unclear. Furthermore, appropriated protocols to adjust the inseminating dose and requirements to implement commercially the intrauterine insemination need to be defined.

This study was performed to evaluate the effects of sperm number in the inseminating dose and of semen backflow on the pregnancy rate and number of embryos of sows inseminated once at 0-24 h before ovulation with intrauterine technique.

#### **Material and methods:**

This experiment was carried out in the Southwest region of Brazil from February to June 2003. A total of 221 pluriparous females (Landrace x Large White) were kept in individual crates after weaning and oestrus detection was performed twice daily by applying the back pressure test in the presence of a mature boar. Sows included in the study presented spontaneous oestrus within 2-6 days after weaning, 2-9 parities, lactation length of 17-23 days and litter size in the last farrowing higher than 10 piglets were included in the study.

After oestrus onset, the sows were examined by real time transcutaneous ultrasonography with a 5 MHz Aloka® (Aloka Co., Ltd., Mure, Mitaka-shi, Tokyo 181-8622, Japan) convex linear transducer to detect the presence or absence of ovarian follicles. Such examination was made at the oestrus onset and at every 12 h interval until ovulation. The time of ovulation was judged to be the moment at which pre-ovulatory follicles could no longer be detected minus 6 h.

Four crossbred boars (Landrace x Large White x Pietrain) with satisfactory semen characteristics were selected as semen donors. The semen was collected twice a week and volume, motility and agglutination were evaluated. The concentration of spermatozoa was

determined by Neubauer improved® counting chamber.

One semen dose per ejaculate was stored at 17°C exclusively for motility evaluation which was performed daily until 240 h after collection. The semen was diluted in Beltsville thawing solution (BTS; Minitub®), packaged in 100 ml bottles with  $1.25 \times 10^9$ ,  $2.5 \times 10^9$  and  $5.0 \times 10^9$  spermatozoa, stored at 17°C and used within 48 h. From each bottle, fractions of 20 ml were separated immediately before insemination resulting in doses of  $0.25 \times 10^9$  (T1),  $0.5 \times 10^9$  (T2) and  $1.0 \times 10^9$  (T3) spermatozoa.

The sows were assigned randomly to the treatment groups and inseminated once at 0-24 h interval before ovulation with a disposable syringe attached to the intrauterine catheter (Verona, Minitub®). Subsequently, an additional 2 ml of BTS extender was used to wash out of the flexible catheter all remaining spermatozoa.

The insemination was performed  $25.3 \pm 4.9$  hours (range 1-33 hours) after oestrus onset, expecting an insemination-ovulation interval from 0 to 24 hours. Ten females out of 221 inseminated were excluded from the statistical analysis because their insemination-ovulation interval was higher than 24 hours.

The semen backflow was collected into human colostomy bags fixed around the vulva for up to 60 minutes after intrauterine insemination in order to assess the number of spermatozoa and total backflow volume in 151 females.

Pregnancy rate was determined at 20-23 days after insemination by real time transcutaneous ultrasonography. The pregnant sows were slaughtered at 34-41 days of gestation and corpora lutea and embryos were counted. The embryos were judged as viable or degenerated based on their morphological characteristics (Nissen et al., 1997).

A chi-square test was performed using the FREQ procedure (SAS, 2000) to compare pregnancy rates. Data concerning number of embryos, embryonic survival and spermatozoa motility during storage were analyzed using GLM procedure (SAS 2000). Backflow volume

and number of spermatozoa were expressed as percentage of the inseminated dose to enable the comparison among the different sperm cell doses. The percentage of sperm and volume of the backflow were submitted to a non-parametric analysis (NPAR1WAY) and the comparison among groups was performed by Kruskal-Wallis test (SAS 2000). The correlation between percentage of spermatozoa and number of embryos was analyzed using CORR procedure. The percentage of sperm in the backflow was also classified in low (less than 15%) and high (more than 15%). The influence of these sperm losses on the pregnancy rate and number of embryos were analyzed using FREQ and GLM procedures, respectively (SAS 2000).

## **Results and discussion**

The insertion of the intrauterine insemination catheter was possible in all females. At the end of insemination procedure, the presence of blood was not verified neither in the catheter nor in the semen backflow, differing from the results of Watson and Behan (2002) and Dallanora et al. (2004) that found, respectively, 1.8% and 9.5% of the females with blood in the catheter, in at least one of the inseminations.

The loss of sperm cells due to backflow has a great importance when low sperm cell doses are used. Steverink et al. (1998) observed that losses superior to 5% of the infused spermatozoa in the traditional insemination influenced negatively the fertilization rate when the number of spermatozoa per dose was reduced from 3 or 6 billion to 1 billion. In the present study, semen backflow at the moment of intrauterine insemination was not observed. These findings are in agreement to Hancock (1959) and Levis et al. (2002), who affirmed that the reduction in the sperm losses during artificial insemination can be one of the advantages of intrauterine semen deposition.

There was no difference ( $P>0.05$ ; Table 1) in the percentage of volume and spermatozoa in the backflow up to 60 minutes after the intrauterine insemination among the

three treatments. The low (inferior to 15%) or high (superior to 15%) percentage of spermatozoa in the backflow did not influence the pregnancy rate. Nevertheless, a negative correlation ( $P < 0.05$ ;  $R = -0.34$ ) was observed between the percentage of spermatozoa in the backflow and the number of embryos. Dallanora et al. (2004) reported a percentage of spermatozoa (22.7%) in the backflow, up to two hours after intrauterine insemination, superior to those observed in this study (12.1 to 17.1%). However, they inseminated with 1.5 billion sperm cell in 60 ml of extender.

In only eight sows backflow did not occur and the volume ranged from 0 to 136%. With traditional insemination, other authors observed backflow volume ranging from 20 to 120% (Steверink et al. 1998) and from 0 to 118% (Wentz et al. 2001). It seems that, in the intrauterine as in the traditional insemination, the presence of secretion from the genital tract makes possible the occurrence of backflow volume superior to 100%. The percentage of backflow volume observed in the intrauterine insemination is similar to that of the traditional insemination (Steверink et al. 1998; Wentz et al. 2001), indicating that backflow after the insemination is a frequent event in swine, independently of the site of deposition and the volume of the inseminating dose.

When the semen is deposited in the cervix, it is necessary to use a great volume in the inseminating dose to ensure an adequate sperm transport to the fertilization site. Performing traditional insemination with 1, 5 or 10 billion spermatozoa in volumes of 20, 100 or 200 ml, Baker et al. (1968) obtained satisfactory results with 100 ml. Hancock and Hovell (1961) suggested that the deposition site of the semen is the most important factor to determine the volume necessary to attain a good reproductive performance. There is no evidence that the sperm transport in the intrauterine insemination is more efficient in the presence of a great volume of fluid. Hancock and Hovell (1961) used 20 ml doses with posterior infusion of 100 ml of extender and observed fertilization rates similar to those of intrauterine inseminations

performed with only 20 ml. These data are confirmed by current studies in which volumes equal or inferior to 20 ml have been used (Martinez et al. 2002; Wolken et al. 2002) without impairing the reproductive performance.

In this study, the females were inseminated 0-24 h before ovulation because this period was considered to be optimal for the traditional insemination (Soede et al. 1995). In females inseminated by intrauterine deposition of 100 or 500 million spermatozoa in 20 ml, Wolken (2001) reported an optimal interval of 12 to 30 h before ovulation. Bennemann et al. (2003) observed no influence of the insemination-ovulation intervals of 0-24 or 25-36 h on the pregnancy rate and number of embryos in pluriparous females submitted to intrauterine insemination with 1 or 2 billion spermatozoa. Studies evaluating the optimal insemination-ovulation interval for intrauterine insemination and its possible interaction with the sperm cell dose number still need to be determined.

The pregnancy rate did not differ ( $P=0.36$ ) among the treatments (Table 2). However, differences were verified among the males within each sperm cell dose ( $P<0.05$ ; Table 2). The reduction of the pregnancy rate was more pronounced in the boar “D”, when doses with  $0.25 \times 10^9$  spermatozoa were used. These results agree with those of Xu et al. (1998) that did not observe boar effect with 3 billion spermatozoa, but found male difference in litter size, when the number of spermatozoa was reduced to 2 billion.

Some authors suggested that *in vitro* sperm motility could estimate boar *in vivo* fertility (Xu et al. 1998; Foxcroft 2002; Popwell and Flowers 2004). Xu et al. (1998) observed that boars with lower motility in the eighth day of semen storage showed a smaller litter size using 2 billion spermatozoa per dose. Foxcroft (2002) also evidenced that the male with lower motility in the tenth day of semen storage presented the smallest pregnancy rate, when inseminating females with 1.5 billion of spermatozoa. However, this was not confirmed in the presente study, because despite their differences in pregnancy rate, males showed similar

motility during ten days of storage at 17°C ( $P>0.05$ ; table 3). In fact, Popwell and Flowers (2004) observed that spermatic characteristics as motility, acrosome morphology, head or tail have limited value to be used as predictors of the fertility for some males. Therefore, it is likely that another important spermatic attribute for the fertilization, apart from motility, was compromised in male “D” and the reduced sperm cell dose reflected this aspect.

After intrauterine insemination with 20 ml of semen *in natura*, Hancock and Hovell (1961) observed reduction in pregnancy rate as the sperm number was reduced from 10 (77%) to 1 (41%) billion. Martinez et al. (2002) inseminated sows with 10, 25, 50 and 150 million spermatozoa diluted in 5 ml. The deep intrauterine insemination was accomplished with aid of an endoscope and a catheter (1.8 meters and 4 millimeters of diameter) and the semen was deposited into the upper first third of one uterine horn. These authors obtained pregnancy rates of 86.3% and 77.8%, with 150 and 50 million spermatozoa, respectively. When the number of spermatozoa was reduced to 25 or 10 million spermatozoa, occurred a significant decrease of pregnancy rates to 51.5% and 39.1%, respectively, indicating that 50 million spermatozoa would be the critical point for attaining good fertility results when using deep intrauterine insemination. On the other hand, when the semen is deposited approximately 20 cm beyond the cervix, the minimum number of spermatozoa still remains unclear. Under field conditions, 1.0 and 1.5 billion of spermatozoa resulted in satisfactory farrowing rates and litter size (Watson and Behan 2002; Dallanora et al. 2003). Although not statistically different, Wolken et al. (2002) observed a reduction in pregnancy rate from 77.3% (500 million of spermatozoa) to 65.2% (100 million). In the present study, the pregnancy rate showed a non significant ( $P>0.05$ ) decrease when the number of spermatozoa was reduced from 500 (85.5%) to 250 million (77.1%). Taken together, these results could indicate a possible detrimental effect on the pregnancy rate when the intrauterine insemination is performed with less than 500 million spermatozoa.

There was no boar effect nor of its interaction with treatment groups on the number of embryos ( $P>0.05$ ). The number of total and viable embryos differed between 250 and 500 million of spermatozoa ( $P<0.05$ ; Table 4). The number of viable embryos with doses of 500 million is similar to that observed ( $12.6 \pm 5.6$ ) by Wolken et al. (2002) who used a single intrauterine insemination, 24-32 h after oestrus onset, with  $0.5 \times 10^9$  spermatozoa in 20 ml. Martinez et al. (2002) did not observe differences in the total live born between the traditional group inseminated with 3 billion spermatozoa (10.0 piglets) and groups inseminated with 150 (9.7 piglets) and 50 (9.4 piglets) million of spermatozoa with deep intrauterine technique.

An advantage of a lower number of spermatozoa per dose in the intrauterine insemination is the possibility of increasing considerably the number of insemination doses produced per male. In the current commercial conditions, one boar can produce up to 2000 doses per year with 3 billion sperm cells. Reducing the sperm number to 500 million per dose, using intrauterine insemination, the number of doses could increase up to 600%.

## **Conclusions**

The percentage of backflow volume in the intrauterine insemination is close to 2/3 of the infused volume. The percentage of spermatozoa in the backflow up to 60 minutes does not vary in function of the number of infused spermatozoa. The motility of semen stored at 17°C during 240 h does not allow to differentiate less fertile males. Using only one intrauterine insemination in an interval of 0-24 h before ovulation, with 0.5 billion of spermatozoa, it is possible to reach a pregnancy rate superior to 85% and a total of 14 embryos at 34-41 days of gestation.

Table 1. Percentage of volume and spermatozoa in the backflow and effect of low (inferior to 15%) or high (superior to 15%) spermatozoa losses on the pregnancy rate and number of total embryos in swine females with a single intrauterine insemination.

		T1 (0.25 x 10 <sup>9</sup> )	T2 (0.5 x 10 <sup>9</sup> )	T3 (1.0 x 10 <sup>9</sup> )
	n	47	47	57
Volume (%)	Mean ± SD	67.8 ± 35.0	63.9 ± 39.8	66.4 ± 30.8
	Median	72.7	59.1	62.8
	Amplitude	0 – 136.4	0 – 136.4	0 – 122.7
Spermatozoa (%)	Mean ± SD	17.1 ± 15.7	12.6 ± 12.3	14.6 ± 13.7
	Median	12.6	8.4	9.5
	Amplitude	0 – 64.8	0 – 49.3	0 – 62.7
Pregnancy Rate (%)	Low	78.6 (22/28)	85.7 (30/35)	88.9 (32/36)
	High	57.9 (11/19)	83.3 (10/12)	71.4 (15/21)
Number of Total Embryos	Low	12.8 ± 4.7 (22)	14.5 ± 4.2 (29)	14.3 ± 5.3 (29)
	High	10.0 ± 5.3 (11)	13.3 ± 5.9 (9)	11.3 ± 4.8 (14)

There was no difference among treatments (P>0.05).

Table 2. Pregnancy rate (PR) according to the male utilized in the intrauterine insemination of swine females.

Treatments	Males								Pregnancy Rate (Mean)
	A		B		C		D		
	n	PR	n	PR	n	PR	n	PR	
T1 (0.25 x 10 <sup>9</sup> )	30	80.0a	7	85.7a	23	95.6a	10	20.0b	77.1A
T2 (0.5 x 10 <sup>9</sup> )	24	79.2ab	9	100.0a b	27	96.3a	9	55.6b	85.5A
T3 (1.0 x 10 <sup>9</sup> )	28	82.1ab	8	87.7ab	26	96.1a	10	60.0b	84.7A

a,b values in the row differ (P<0.05).

There was no difference among treatments within males (P>0.05).

A in the column do not differ (P>0.05).



Table 3. Sperm motility of the males utilized as donors to intrauterine insemination.

Males	n	Motility (LSmeans $\pm$ standard deviation)					
		Post-dilution	48 h	96 h	144 h	192 h	240 h
A	9	93.3 $\pm$ 2.5	86.1 $\pm$ 4.8	83.9 $\pm$ 3.3	85.0 $\pm$ 3.5	83.3 $\pm$ 5.6	79.8 $\pm$ 8.6
B	3	91.7 $\pm$ 2.9	88.3 $\pm$ 2.9	86.7 $\pm$ 5.8	85.0 $\pm$ 5.0	75.0 $\pm$ 13.3	73.3 $\pm$ 20.2
C	12	93.7 $\pm$ 2.3	88.3 $\pm$ 2.5	86.7 $\pm$ 3.2	82.9 $\pm$ 5.4	80.0 $\pm$ 8.0	67.9 $\pm$ 20.0
D	5	93.3 $\pm$ 2.7	89.0 $\pm$ 4.2	85.0 $\pm$ 5.0	78.0 $\pm$ 4.5	74.0 $\pm$ 14.3	71.0 $\pm$ 18.2

There was no difference among males ( $P > 0.05$ ).

Table 4. Reproductive performance of swine females submitted to a single intrauterine insemination (LSmeans  $\pm$  standard deviation)

Treatments	Females		Corpora Lutea	Embryos		Embryo Survival
	Inseminated	Slaughtered		Total	Viable	
0.25 x 10 <sup>9</sup>	70	51	26.2 4.0a	$\pm$ 11.7 $\pm$ 4.7a	10.8 4.0a	$\pm$ 43.0 $\pm$ 16.7a
0.5 x 10 <sup>9</sup>	69	57	23.8 7.3a	$\pm$ 14.3 $\pm$ 4.2b	12.8 3.5b	$\pm$ 50.7 $\pm$ 15.3b
1.0 x 10 <sup>9</sup>	72	57	25.6 4.3a	$\pm$ 13.3 5.1ab	$\pm$ 12.2 $\pm$ 4.8ab	47.9 $\pm$ 18.9ab

a,b Values followed by different letters, in the column, differ ( $P < 0.05$ ).

## 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.

Bennemann PE, Milbradt E, Diehl GN, Vidor R, Fries HCC, Bernardi M, Wentz I, Bortolozzo FP, 2003: Intrauterine insemination in sows with reduced sperm number in two intervals before ovulation. In: 5th International Conference on Boar Semen Preservation. Program and Abstract Book. Session IV, p. 48.

Dallanora D, Mezalira A, Katzer LH, Bernardi ML, Bortolozzo FP, Wentz I. Volume and sperm number in the semen backflow after intrauterine or cervical insemination in sows. In: 15th International Congress on Animal Reproduction, 2004, Porto Seguro-Brazil (in press).

Dallanora D, Mezalira A, Katzer LH, Bernardi ML, Bortolozzo FP, Wentz I, 2003: Intrauterine insemination with reduced sperm number on a commercial pig farm. In: 5th International Conference on Boar Semen Preservation. Program and Abstract Book. Session IV, p. 50.

Foxcroft GR, 2002: Melhorando os resultados na inseminação artificial e monta natural. Minicurso de Reprodução. In: I Congresso Latino Americano de Suinocultura. Foz do Iguaçu, PR, Brasil, p. 25-37.

Hancock JL, 1959: Pig insemination technique. *Vet Rec* **71**, 523-527.

Hancock JL, Hovell JR, 1961: The effect of semen volume and number of spermatozoa on the fertility of intra-uterine inseminations of pigs. *Anim Prod* **3**, 153-160.

Levis DG, Burroughs S, Williams S, 2002: Use of intrauterine insemination of pigs: pros, cons & economics. Ohio Pork Industry Center. Available in <<http://www.porkinfo.osu.edu>>.

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

Nissen AK, Soede NM, Hyttel P, Schmidt M, D'Hoore L, 1997: The influence of time of insemination relative of ovulation on farrowing frequency and litter size in sows, as investigated by ultrasonography. *Theriogenology* 47, 1571-1582.

Popwell JM, Flowers, LW, 2004: Variability in relationships between semen quality and estimates of in vivo and in vitro fertility in boars. *Anim Reprod Sci* 81, 97-113.

SAS INSTITUTE (Cary, NC), 2000: Sas user's guide: Statistical Analysis System, Release 6.12.

Soede NM, Wetzels CCH, Zondag W, De Koning MAI, Kemp B, 1995: Effects 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, Kemp B, 1998: Influence of insemination to ovulation interval and sperm cell dosage on fertilization in sows. *Anim Reprod Sci* 54, 109-119.

Vazquez JL, Martinez EA, Vazquez JM, Lucas X, Gil MA, Parrilla I, Roca J, 2000: Development of a non-surgical deep intrauterine insemination technique. In: International Conference on Boar Semen Preservation Congress, IV. Proceedings. Beltsville, USA, 115-118.

Watson PF, Behan JR, 2002: Intrauterine Insemination of sows with reduced sperm numbers: results of a commercially based field trial. *Theriogenology* 57, 1683-1693.

Wentz I, Flores LAS, Bortolozzo FP, Borchardt Neto G, Balestrin R, Gava G, Kummer R, 2001: Evaluation of artificial insemination methods for swine. Sixth International Conference on Pig Reproduction, Proceedings, p.103.

Wolken A, Rath D, Bortolozzo FP, Wentz I, Marquetti A, 2002: Sows can successfully be inseminated non-surgically into the distal uterine horn with a highly reduced number of sperm cells. *Theriogenology* 57, p. 392.

Wolken A, 2001: Untersuchungen zur unchirurgischen und chirurgischen distalen intrauterinen Besamung mit reduzierter Spermienzahl bei Jung-und Altsauen. Tierärztliche Hochschule, Hannover. Dissertation.

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

Authors' adress (for correspondence): Fernando Pandolfo Bortolozzo, Setor de Suínos, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves, 9090, CEP 90540-000, Porto Alegre - RS, Brasil. E-mail: [fpbortol@ufrgs.br](mailto:fpbortol@ufrgs.br)

Fone/fax: 0055 (0)51 3316 6132

**List of Tables:**

Table 1. Percentage of volume and spermatozoa in the backflow and effect of low (inferior to 15%) or high (superior to 15%) spermatozoa losses on the pregnancy rate and number of total embryos in swine females with a single intrauterine insemination.

Table 2. Pregnancy rate (PR) according to the male utilized in the intrauterine insemination of swine females.

Table 3. Sperm motility of the males utilized as donors to intrauterine insemination.

Table 4. Reproductive performance of swine females submitted to a single intrauterine insemination (LSmeans  $\pm$  standard deviation)

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados dos trabalhos realizados em condições experimentais ou em condições de campo indicam que é possível ultrapassar os anéis cervicais e alcançar o útero em mais de 90% das fêmeas multíparas, sem dificuldades (MARTINEZ et al. 2002; WATSON, BEHAN, 2002; DALLANORA et al. 2003b). Também tem sido relatado que, com um breve treinamento, a equipe de inseminação das granjas passa a realizar a IAU com facilidade (WATSON, BEHAN, 2002).

A utilização dos métodos de IAU, atualmente está vinculada ao custo dos instrumentos utilizados (LEVIS et al., 2002). Outro fator limitante é a impossibilidade de utilização em leitoas e primíparas, provavelmente devido a particularidades anatômicas do trato genital (LEVIS et al. 2002). Mais recentemente, tem sido proposta a utilização de um novo cateter (ECHEGARAY, 2003), o qual dispensa o uso da pipeta guia. A utilização desse instrumento está começando a ser avaliada, existindo grande expectativa, pois é proposto poder ser utilizado em nulíparas e primíparas e ter custo menor que os instrumentos existentes para IAU.

Para a produção de doses com reduzido número de espermatozóides alguns procedimentos envolvendo a rotina de produção de doses de sêmen precisam ser reorganizados. Ao utilizar doses com 500 milhões, por exemplo, a taxa de diluição é superior à empregada na tecnologia tradicional. Além disso, todo material de consumo relacionado ao envase das doses inseminantes é produzido em função do volume de 80-100 ml. Sob o ponto de vista econômico, além da redução no número de machos necessários, essa tecnologia também reduz o volume de diluente utilizado.

Para o procedimento de determinação da concentração do ejaculado passa a ser fundamental a utilização de métodos precisos, pois são utilizadas doses com número muito reduzido de espermatozóides e variações passam a ter importância maior.

O uso de doses com reduzido número de células espermáticas faz com que um único macho tenha um impacto muito grande sobre o rebanho. Bortolozzo et al. (2002), estimaram que, utilizando um protocolo com 24 horas de intervalo entre inseminações e doses de 1 bilhão de espermatozóides (IAU somente em multíparas), um macho poderia atender 454 fêmeas, enquanto que no mesmo intervalo entre inseminações e doses de 3 bilhões, um macho atenderia 254 fêmeas. Com isso, a necessidade de informação sobre a fertilidade dos machos utilizados passa a ser muito importante. Pesquisas sobre a utilização de “pool” de sêmen para produção das doses podem ser um caminho para amenizar possíveis problemas de sub-

fertilidade dos machos. Da mesma forma que a pesquisa abordando testes que possam identificar esses animais sub-férteis em curto espaço de tempo e antes de sua introdução no plantel seriam de grande valor.

Talvez ainda não existam informações suficientes para que exista um julgamento sobre a possibilidade prática de utilização dessa nova tecnologia a campo. Mais trabalhos precisam ser realizados, principalmente utilizando doses com reduzido número de espermatozoides, em diferentes intervalos pré-ovulatórios e intervalos entre inseminações, em condições de campo, para que realmente possa ser avaliada a sua aplicabilidade prática.

## REFERÊNCIAS

- 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. Desempenho reprodutivo de fêmeas suínas submetidas à inseminação intra-uterina com 1 e 2x10<sup>9</sup> espermatozoides em diferentes intervalos pré-ovulatórios. In: Congresso da Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, XI, 2003, Goiânia. **Anais**. Goiânia, p.211-212, 2003.
- BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, IVO; DALLANORA, D. Avanços na inseminação artificial de suínos. In: ENCONTRO TÉCNICO DA ABRAVES-RS, 2002, Estrela, **Anais**. Estrela, p. 1-20, 2002.
- DALLANORA, D.; MEZALIRA, A.; KATZER, L.H. et al. Volume e número de espermatozoides no refluxo de fêmeas suínas após a inseminação intra-uterina. In: Congresso da Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, XI, 2003, Goiânia. **Anais**. Goiânia, p.215-216, 2003a.
- DALLANORA, D.; MEZALIRA, A.; KATZER, L.H. et al. Desempenho reprodutivo de fêmeas suínas inseminadas com deposição intra-uterina de sêmen e reduzido número de espermatozoides. In: Congresso da Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, XI, 2003, Goiânia. **Anais**. Goiânia, p.213-214, 2003b.
- ECHEGARAY, A. Análisis de las nuevas técnicas y avances en la inseminación artificial porcina. In: Congresso da Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, XI, 2003, Goiânia. **Anais-Palestras**. Goiânia, p.118-125, 2003.
- FOXCROFT, G.R. Melhorando os resultados na inseminação artificial e monta natural. Minicurso de Reprodução, I Congresso Latino Americano de Suinocultura. Foz do Iguaçu, PR, Brasil, p.25-37, 2002.
- FLORES, L.A.S. Comparação entre os métodos “auto-IA”, intermediário e tradicional de inseminação artificial em suínos. 2001. 61f. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.
- GARNER, D. L.; HAFEZ, E. S. E. Spermatozoa and Seminal Plasma. In: HAFEZ, E. S. E. **Reproduction in Farm Animals**. Lea & Febiger, Kiawah Island, South Carolina, 6th Edition, p.165-187, 1993.
- HANCOCK, J.L. Pig insemination technique. **Veterinary Record**, v.71, p.527, 1959.
- HANCOCK, J.L. e 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.
- KRUEGER, C.; RATH, D.; JOHNSON, L.A. Low Dose insemination in synchronized gilts. **Theriogenology**, v.52, p.1363-1373, 1999.



LANGENDIJK, P.; BOUWMAN, E.G.; SOEDE, N.M. et al. Myometrial activity around estrus in sows: spontaneous activity and effects of estrogens, cloprostenol, seminal plasma and clenbuterol. **Theriogenology** v.57, p.1563-1577, 2002.

LEVIS, D.G.; BURROUGHS, S.; WILLIAMS, S. Use of intrauterine insemination of pigs: pros, cons e economics. **Ohio Pork Industry Center**, 2002. Disponível em <<http://www.porkinfo.osu.edu>>. Acesso em 01 nov. 2002.

MARTINEZ, E.A.; VAZQUEZ, J.M.; ROCA, J. 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.; 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.

MATHIAS, K. Understanding the differences between artificial insemination (AI), intrauterine insemination (IUI), and deep intra-uterine insemination (DIUI). **American Association of Swine Veterinarians**, 2003.

POPWELL, J.M.; FLOWERS, L.W. Variability in relationships between semen quality and estimates of in vivo and in vitro fertility in boars. **Anim. Reprod. Sci.** Article in press (2003).

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

ROCA, J.; CARVAJAL, G.; LUCAS, X. et al. Fertility of weaned sows after deep intrauterine insemination with a reduced number of frozen-thawed spermatozoa. **Theriogenology**, v.60, n.1, p.77-87, 2003.

RODRÍGUEZ-MARTINEZ, H.; WALLGREN, M. Factores que influncian la calidad espermática en verracos. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL MINITUB “INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM SUÍNOS”, III, 2000, Flores da Cunha. **Anais**. Flores da Cunha, Brasil, 2000, p.34-41.

RODRÍGUEZ-MARTINEZ, H.; ERIKSSON, B. Evaluación del semen de verraco y su relación con fertilidad. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL MINITUB “INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM SUÍNOS”, III, 2000, Flores da Cunha. **Anais**. Flores da Cunha, Brasil, 2000, p. 13-33.

SCHEID, I.R. Commercial swine artificial insemination in Brazil: development and current use. **Reproduction in Domestic Animals**, Suppl. 1, p.299-301. 1991.

STEVERINK D.W.B.; SOEDE, N.M.; KEMP, B. Influence of insemination to ovulation interval and sperm cell dosage on fertilization in sows. **Animal Reproduction Science**. v.54, p.109-119. 1998.

VAZQUEZ, J.L.; MARTINEZ, E.A.; VAZQUEZ, J.M. et al. Development of a non-surgical deep intrauterine insemination technique. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BOAR

SEMEN PRESERVATION CONGRESS, IV, 2000, Beltsville. **Proceedings**. Beltsville, USA, p.115-118, 2000.

VAZQUEZ, J.M.; MARTINEZ, E.A.; PARRILLA, I. et al. Birth of piglets after deep intrauterine insemination with flow cytometrically sorted boar spermatozoa. **Theriogenology**, v.59, n.7, p.1605-1614, 2002.

VIRING, S.; EINARSSON, S. Sperm distribution within the genital tract of naturally inseminated gilts. **Nordisch Veterinarian Medicine**. v.33, p.145-149, 1981.

XU, X.; POMIER, S.; ARBOV, T. et al. In vitro maturation and fertilization techniques for assessment of semen quality and boar fertility. **J. Anim. Sci.**, v.76, p.3079-3089, 1998.

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

WENTZ, IVO; VARGAS, A.J.; BORTOLOZZO, F.P.B. et al. Situação atual da inseminação artificial em suínos no Brasil e viabilização econômica do emprego dessa biotécnica. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL MINITUB "INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM SUÍNOS". 3., 2000, Flores da Cunha-RS. **Anais**. Flores da Cunha, p.5-12. 2000.

WOLKEN, A. Untersuchungen zur unchirurgischen und chirurgischen distalen intrauterinen Besamung mit reduzierter Spermienzahl bei Jung-und Altsauen. Tierärztliche Hochschule, Hannover. **Dissertation**. 2001.

WOLKEN, A.; RATH, D.; BORTOLOZZO, F.P. 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.

### APÊNDICE A - Seleção das Fêmeas

Tabela 1 - Ordem de parto (OP), escore corporal visual (ECV), intervalo desmame estro (IDE), média do número leitões nascidos totais nos partos anteriores (XTL) e duração da lactação (DLAC), média  $\pm$  desvio padrão por tratamento e geral das fêmeas selecionadas para o experimento.

Tratamentos	OP	ECV	IDE	XTL	DLAC
250 milhões de sptz	4,9 $\pm$ 1,6	3,3 $\pm$ 0,4	4,1 $\pm$ 0,7	11,3 $\pm$ 1,1	20,0 $\pm$ 1,2
500 milhões de sptz	5,0 $\pm$ 1,7	3,4 $\pm$ 0,3	4,1 $\pm$ 0,8	11,2 $\pm$ 1,0	19,9 $\pm$ 1,4
1,0 bilhão de sptz	4,8 $\pm$ 1,7	3,3 $\pm$ 0,4	4,0 $\pm$ 0,8	11,1 $\pm$ 1,4	20,2 $\pm$ 1,5
Geral	4,9 $\pm$ 1,7	3,3 $\pm$ 0,4	4,1 $\pm$ 0,8	11,2 $\pm$ 1,2	20,0 $\pm$ 1,4

sptz = espermatozoides; P>0,05