UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

DARLETE LIMA MATOS

SOBREVIVÊNCIA *IN VITRO* E FERTILIDADE DO SÊMEN SUÍNO DILUÍDO EM DIFERENTES TAXAS DE DILUIÇÃO E CONSERVADO A 17 ºC

FORTALEZA-CE
2008

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

DARLETE LIMA MATOS

SOBREVIVÊNCIA *IN VITRO* E FERTILIDADE DO SÊMEN SUÍNO DILUÍDO A DIFERENTES TAXAS DE DILUIÇÕES E CONSERVADO A 17 ºC

FORTALEZA-CE
2008

DARLETE LIMA MATOS

SOBREVIVÊNCIA *IN VITRO* E FERTILIDADE DO SÊMEN SUÍNO DILUÍDO A DIFERENTES TAXAS DE DILUIÇÕES E CONSERVADO A 17 ºC

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.
Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.
Linha de Pesquisa: Reprodução e sanidade de carnívoros, onívoros, herbívoros e aves.
Orientador: Prof. Dr. Airton Alencar de Araújo

FORTALEZA-CE
2008

M425s Matos, Darlete Lima

Sobrevivência *in vitro* e fertilidade do sêmen suíno diluído a diferentes taxas de diluições e conservado a 17 ºC/ Darlete Lima Matos. _ Fortaleza, 2008

79p.

Orientador: Prof. Dr. Airton Alencar de Araújo

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará Faculdade de Veterinária, Faculdade de Veterinária

1. Dose inseminante 2. Inseminação artificial 3. Varrão I. Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária

CDD: 636.4

DARLETE LIMA MATOS

SOBREVIVÊNCIA *IN VITRO* E FERTILIDADE DO SÊMEN SUÍNO DILUÍDO A DIFERENTES TAXAS DE DILUIÇÕES E CONSERVADO A 17 ºC

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre/ em Ciências Veterinárias.

Aprovada em: ____/_____/_____

Banca Examinadora

_____
Prof. Dr. Airton Alencar de Araújo
Orientador – UECE

_____
Prof. Dr. Ricardo Toniolli
Co-Orientador-UECE

_____
Prof. Dr. Luiz Euquério de Carvalho
Examinador - UFC

"De tudo ficaram três coisas:

A certeza de que estamos sempre começando

A certeza de que é preciso continuar

E a certeza de que seremos interrompidos antes de terminar.

Portanto, devemos fazer da interrupção um caminho novo

Da queda um passo de dança

Do medo uma escada

Do sonho uma ponte

Da procura um encontro."

Fernando Sabino

À Deus pela companhia e por me fazer acreditar que eu posso!

AGRADECIMENTOS

À Deus por estar sempre ao meu lado me dando forças, coragem e esperanças de alcançar os meus objetivos.

A Universidade Estadual do Ceará pela oportunidade de aprimorar os meus conhecimentos e realizar mais um sonho.

A Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico FUNCAP pelo apoio financeiro durante minha vida acadêmica no mestrado, contribuindo para que eu tivesse condições de concluir essa etapa de minha vida.

Aos meus pais, Vicente Matos e Rosa Lima Matos, pelo apoio incondicional as minhas metas profissionais e por acreditarem no meu sonho sacrificando suas vidas em função da minha e não medindo esforços para que eu pudesse alcançar meus objetivos.

À minha irmã Darlene Matos por ser minha maior incentivadora.

Ao meu orientador, Dr. Airton Alencar de Araújo por ter me dado a oportunidade de realizar o Mestrado Acadêmico. Pela orientação, disposição e paciência com as minhas limitações e dificuldades. Declaro aqui minha admiração pelo seu exemplo de Médico Veterinário e Pesquisador.

Ao meu co-orientador Dr. Ricardo Toniolli, que desde meu primeiro dia nas instalações do LRSTS, sempre me prestou ajuda e orientação. Que esteve presente nos meus primeiros ensaios de tecnologia de sêmen suíno, me ensinando os procedimentos de forma clara e prática e por permitir que eu fizesse parte de sua equipe de trabalho. Meu eterno reconhecimento, gratidão e respeito.

A minha grande amiga-irmã Iara Gonçalves pelo carinho que teve comigo. Por ser uma companheira impar nessa caminhada, não medindo empenho para me ajudar, tanto na minha vida pessoal quanto profissional. Minha admiração pela grande profissional e gratidão pela incomparável amizade.

À amiga Ana Priscilla Melo Jardim por ter escutado minhas constantes angustias, alegrias e decepções e pelo companheirismo e distração nas horas fáceis e difíceis.

Às amigas Karina Salles, Ana Michele, Tatyane Bandeira por serem meu refugio nos momentos de distração.

Ao Doutorando Marcelo José da Ascensão Feitosa Vieira, pela convivência agradável. Um exemplo de profissional que encara os problemas, procurando sempre ver o lado positivo.

A Doutoranda Maria Gorete Salles, pelo apoio, respeito, consideração e conselhos durante o Mestrado.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Estadual do Ceará (PPGCV-UECE), por dividirem seus conhecimentos e experiências nas salas de aula.

Aos funcionários da Granja Regina em especial ao Sr. Carlos Braga, Raimundo Nonato e Elizete Vieira, por permitir o uso de seus animais e pelo auxílio e disposição na realização desse experimento.

Aos funciónarios do setor de suinocultura Rocilda de Oliveira, Antonio Tabosa, Alicio Albano e Eliude Barbosa .

A equipe do LTSCO, Dr. José Ferreira Nunes, Cristiane Clemento e Maria Audália Marques.

Aos colegas do Mestrado da turma 2007, pelo convívio agradável e discussões nas salas de aula, que sem exceção, formam um grupo seleto de profissionais bem sucedidos e competentes em suas áreas de conhecimento.

Aos pós-graduandos e alunos de iniciação científica, do LTSCO, Marcella Moreira Clemente de Mello, José Mauricio Cavalcante, Nathalie Ommundsen Pessoa, Oscar Oliveira Brasil, Divens Firmino, Edgar e Mateus Diógenes, pela coexistência, proporcionando

momentos de alegrias e descontração durante o Mestrado.

Por fim, agradeço aos desafios que apareceram pelo caminho sob diferentes formas e que me deixaram a clara certeza de que seguir é preciso, por mais difícil que seja, pois não existe vitória onde não houve algum tipo de luta.

SUMÁRIO

RESUMO..... ix
ABSTRACT..... x
LISTA DE QUADROS..... xi
LISTA DE TABELAS..... xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS..... xiii
1. INTRODUÇÃO..... 17
2. REVISÃO DE LITERATURA..... 19
2.1 O sêmen suíno..... 19
2.1.1 Plasma seminal..... 19
2.1.2 Viabilidade e morfologia espermática..... 20
2.2 Tecnologia do sêmen suíno..... 21
2.2.1 Inseminação artificial..... 21
2.2.2 Aspectos fisiológicos do transporte espermático..... 22
2.2.3 Técnicas de inseminação artificial..... 24
2.2.4 Dose inseminante..... 26
2.2.5 Conservação do sêmen..... 28
2.2.6 Fatores que influenciam na qualidade da dose inseminante..... 29
2.2.7 Avaliação objetiva da qualidade espermática..... 30
3 JUSTIFICATIVA..... 33
4 HIPÓTESE CIENTIFICA..... 34
5 OBJETIVOS..... 35
5.1 Objetivo geral..... 35
5.2 Objetivos específicos..... 35
6 CAPÍTULO 1 Análise computadorizada de sêmen: revisão..... 36
7 CAPITULO 2 Sobrevivência espermática em diferentes taxas de diluição do sêmen do varrão..... 54
8 CONCLUSÕES..... 69
9 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS..... 70
10 ANEXOS

RESUMO

A inseminação artificial (IA) na espécie suína é uma técnica já bem estabelecida na rotina das centrais de produção, porém, para serem alcançados lucros é fundamental cada vez mais seu aperfeiçoamento. Assim, a pesquisa nessa área tem buscado reduzir os custos com cobertura e potencializar o emprego dos machos geneticamente superiores, destacando-se pesquisas que buscam desenvolver protocolos de IA, utilizando um reduzido número de espermatozóides/fêmea/ano. Dessa maneira, o objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* e *in vivo* o efeito das concentrações de espermatozóides por dose inseminante, a fim de determinar o número mínimo de espermatozóides por dose inseminante na inseminação artificial tradicional sem alterar o desempenho reprodutivo das fêmeas suínas. O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Tecnologia do Sêmen Suino(LRSTS), Laboratório de Tecnologia do Sêmen Caprino e Ovino(LTSCO) da FAVET-UECE e Granja Regina em Maranguape/CE. O sêmen de quatro reprodutores da linhagem Dalland foi coletado uma vez por semana, durante 10 semanas consecutivas. Após separada a parte gelatinosa, foi realizada a avaliação do volume (ml), concentração($x10^6$sptz/ml), vigor(0 a 5) e motilidade espermática(%). Posteriormente, foi feita a diluição em BTS para produção de doses inseminantes (DI) nas concentrações de 1; 2 e $3,5x10^9$. As amostras foram acondicionadas por 3 dias em temperatura de 17 °C. A cada dia de conservação foi realizado o monitoramento objetivo dos parâmetros de motilidade espermática (porcentagem de móveis, VAP e LIN) usando o sistema computadorizado de análise de sêmen (CASA). Para a etapa in vivo foram selecionadas as D.I de melhores resultados na etapa in vivo. Noventa fêmeas suínas foram divididas em três tratamentos sendo 30 fêmeas inseminadas com DI de 3,5 x 109 spzt/ml usando pipeta Goldenpig (controle), 30 fêmeas inseminadas com DI de 2 x 10^9 spzt/ml e 30 fêmeas inseminadas com D.I de 3,5 x 10^9 spzt/ml usando pipeta Goldengilt. Foram calculadas as taxa de não retorno ao estro, de parição e prolificidade. Observou-se na etapa *in vitro* que a D.I de 1 x 10^9 apresentou a menor porcentagem de espermatozóides móveis e menores valores de VAP e LIN quando comparada com os demais tratamentos. Na etapa *in vivo*, observou-se não existir diferença nas taxas de fertilidade quando comparadas as DI de 2 e 3,5 $x10^9$ sptz. Concluíu-se que a redução do número de espermatozóides para 1 x 10^9 por dose inseminante não teve efeito benéfico sobre a sobrevivência espermática *in vitro*, e parâmetros aceitáveis de fertilidade foram encontrados na DI de 2 x 10^9 , o que possibilita a produção de 2 a 3 vezes mais doses por ejaculado.

Palavras-chave: Dose inseminante, inseminação artificial, suíno.

ABSTRACT

The artificial insemination (AI) in swine is a technique already well established in the routine of generating plants, however, to be achieved profits is increasingly important fine tuning. Thus, the research in this area has sought to reduce costs and increase coverage with the use of genetically superior males, especially studies that seek to develop protocols for AI, using a small number of sperm / female / year. Thus, the objective of this study was to evaluate in vitro and in vivo effect of the concentration of sperm per insemination to determine the minimum number of sperm per insemination dose of artificial insemination without changing the traditional reproductive performance of sows. The experiment was conducted at the Laboratory of Technology Semen Suina (LRSTS), Laboratory of Technology of Sheep and Goat Semen (LTSCO) of FAVET-UECE and Granja Regina in maranguapé/CE. The sperm of four players to race Dalland was collected once a week for 10 consecutive weeks. After separate the jelly, was held to assess the volume (ml), concentration (x106sptz/ml), force (0 to 5) and sperm motility (%). Later, was the dilution in BTS to produce doses insemination (DI) at concentrations of 1; 2 and 3.5 x10^9. The samples were packed for 3 days at a temperature of 17 °C. Every day of conservation was the purpose of tracking parameters of sperm motility (percentage of furniture, VAP and LIN) using the computerized analysis of semen (CASA). To step in vivo were selected from the best in the DI stage in vivo. Ninety females were divided into three treatments and 30 females inseminated with DI of 3.5 x 10^9 spzt / ml using pipette Goldenpig (control), 30 females inseminated with DI of 2 x 10^9 spzt / ml and 30 females inseminated with DI, 3, 5 x 10^9 spzt / ml Goldengilt using pipette. We calculated the rate of no return to estrus, from birth and prolificacy.It was observed in vitro in step that the DI of 1 x 109 had the lowest percentage of sperm and lower values of VAP and LIN when compared with other treatments. In step in vivo, we observed no difference in fertility rates when compared to the DI of 2 and 3.5 x10^9 sptz. Concluded that the reduction in the number of sperm for 1 x 10^9 per dose insemination has no beneficial effect on survival sperm in vitro, and acceptable methods of fertility parameters were found in the DI of 2 x 10^9, which enables the production of 2 to 3 times more doses per ejaculate.

Keywords: Artificial insemination, pig, dose insemination

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Parâmetros da motilidade espermática obtidos por meio da CASA..... 31

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

Figura 1. Velocidades obtidas pelo sistema CASA. VAP: velocidade média da trajetória; VCL: velocidade curvilinear; VSL: velocidade linear progressiva..... 32

LISTA DE TABELAS

Capitulo 2

Tabela 1. Avaliação objetiva (CASA). Parâmetros de motilidade espermática do sêmen suíno com diferentes totais de espermatozóides em doses inseminates conservados por 72 horas..... 60

Tabela 2. Qualidade acrossomal e vitalidade espermática no sêmen suíno, em amostras de dose inseminantes com diferentes números de espermatozóides 63

Tabela 3. Morfologia espermática do sêmen suíno diluído de acordo com o numero de espermatozóides por dose e período de conservação..... 64

Tabela 4. Resultados de fertilidade de fêmeas inseminadas com doses de sêmen apresentando diferentes totais de células por dose..... 65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALH	:Amplitude de deslocamento lateral da cabeça
CASA	: Análise de sêmen auxiliada por computador
DI	: Dose inseminante
IA	: Inseminação artificial
IAT	: Inseminação artificial tradicional
IAIU	: Inseminação artificial intra-uterina
IAIUP	: Inseminação artificial intra-uterina profunda
LIN	: Linearidade
PS	: Plasma seminal
STR	: Retilinearidade
SPTZ	: Espermatozóide
SPTZ/ml	: Espermatozóide/ml
VAP	: Velocidade média da trajetória
VCL	:Velocidade curvilinear
VSL	:Velocidade linear
um/s	: Micrômeros por segundo
ul	: Microlitro

1- INTRODUÇÃO

A biotecnologia da reprodução avaliada no rebanho suíno é representada quase que exclusivamente pelo emprego de inseminação artificial (IA) com sêmen diluído e conservado em refrigerador. Essa é uma prática mais econômica trazendo benefícios pela difusão rápida de características desejáveis no rebanho. Atualmente, mais de 50% do total de fêmeas em produção no mundo são inseminadas artificialmente com sêmen resfriado. Em países como EUA e Espanha, estas porcentagens ainda são superiores a 85% dos animais (CORREA et al., 2001)

Na inseminação artificial tradicional (IAT), realizada na região das pregas cervicais do trato reprodutivo da fêmea suína, utiliza-se a D.I com concentração de 2,5 a 4 x 10^9 de espermatozóides diluídos em 80-100 ml de diluidor e a inseminação é repetida de 2 a 3 vezes durante o estro totalizando até 12 x 10^9 de espermatozóides inseminados/fêmea/estro (STEVERINK et al., 1998; WATSON e BEHAN, 2002).

A necessidade de grande volume e número de espermatozóides na dose deve-se, provavelmente, as dificuldades anatômicas da cérviz e cornos uterinos da fêmea suína que representam grandes barreiras fisiológicas à chegada das células espermáticas ao reservatório na junção útero-tubárica (RATH, 2002).

Na última década, as pesquisas com I.A confirmam a possibilidade de se reduzir o número de espermatozóides com a deposição pós-cervical da dose inseminante (DI) desde a bifurcação dos cornos uterinos, por meio da inseminação artificial intra-uterina (IAIU) (KRUEGER et al., 1999) até próximo a junção útero-tubárica por meio da inseminação artificial intra-uterina profunda (IAIUP) (MARTINEZ et al., 2002).

Porém, a deposição pós-cervical necessita de instrumentos adequados e não pode ser realizada de forma rotineira. Apresentam alto custo e podem ainda aumentar a chance de causar ou agravar injúrias cervicais ou uterinas já existentes. Dessa maneira, surge a necessidade de soluções técnicas que permitam a redução do volume da D.I e o número total de espermatozóides/dose e que possam ser aplicadas rotineiramente sem inviabilizar a técnica.

Baseado nisso e considerando que nas condições da região nordeste do Brasil, a IAT com sêmen suíno resfriado é uma alternativa mais viável e possível de ser difundida em relação à IAIU por laparoscopia, por exemplo, o objetivo deste trabalho foi determinar a concentração mínima de espermatozóides por dose inseminante para a utilização na

inseminação artificial sem prejudicar o desempenho reprodutivo das fêmeas suínas, modificando apenas a pipeta utilizada tradicionalmente.

A redução do número de espermatozóides por dose de sêmen possibilitará inseminar um efetivo maior de fêmeas sem perdas de fertilidade e prolificidade, otimizando, desse modo, o uso de ejaculados de machos nos rebanhos, sendo possível ainda reduzir o volume total das doses, resultando na economia da quantidade de diluidor consumido, o que pode ser direcionada a aquisição de diluidores de maior qualidade e maior período de armazenamento.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O sêmen suíno

O ejaculado do varrão é uma suspensão de espermatozóides em um fluído (plasma seminal) composto de uma mistura de conteúdos da cauda do ducto epididimal e secreções das glândulas acessórias. O ejaculado é então composto de uma série de frações usualmente chamada pré-esperma (dominada pela secreção uretral, das glândulas bulbouretrais bem como da próstata), fração rica (no qual contém grande quantidade de espermatozóides) e fração pós-rica (que contém menos espermatozóides). A fração gelatinosa que coagula o plasma seminal como observado após a ejaculação serve *in vivo* para reter o ejaculado no útero também minimizando o refluxo através da cérviz (RODRIGUEZ-MARTINEZ et al., 2005).

2.1.1 Plasma seminal

O plasma seminal é a porção fluida do sêmen, incorporada durante a ejaculação e formada por uma mistura de líquidos secretados pelas glândulas sexuais acessórias (vesiculares, bulbo-uretrais, próstata) pelo epidídimo e ducto deferente. Atua como veículo para os espermatozóides serem transportados do trato genital masculino, ativa sua motilidade e proporciona um meio rico em nutrientes e tamponado, necessário para manter a sobrevivência dos espermatozóides após sua deposição no trato genital feminino (BRAZ, 2003).

Numerosos componentes inorgânicos e orgânicos estão em solução no plasma seminal. Os íons Cl^-, Na^+ e K^+ estão diretamente relacionados com a manutenção da excitabilidade dos espermatozóides, pH ideal do sêmen e pressão osmótica constante dentro e fora das células espermáticas.

Entre os componentes inorgânicos estão: açucares lipídios, minerais e proteínas especiais incluindo enzimas, hormônios, fatores de crescimento, inibidores e inibina dentre outros. A presença ou ausência de muitos desses componentes podem estar envolvida com a fertilidade. As proteínas do plasma seminal exercem múltiplos efeitos sobre a função espermática e desempenham um importante papel na capacitação dos espermatozóides, traduzido por um complexo processo que habilita a célula espermática a penetrar, através da zona pelúcida, por meio da reação acrossômica.

Alguns compostos orgânicos servem como substâncias energéticas para os espermatozóides a exemplo da frutose, do sorbitol. Outros componentes presentes e que não

são fontes de energia são o ácido cítrico e inositol. A frutose é a principal fonte de energia do sêmen, podendo ser metabolizada em condições anaeróbicas (durante a conservação do sêmen) ou aeróbicas (no trato genital feminino). A utilização anaeróbica da frutose produz acido lático o qual se acumula quando o sêmen é conservado e provoca redução do pH seminal, afetando negativamente a viabilidade dos espermatozóides.

Embora não existam dúvidas que o plasma seminal influencie a fisiologia espermática, aumenta a motilidade na ejaculação e estabilize a membrana, outras frações como as secreções das glândulas bulbouretrais tem mostrado ser capaz de reduzir a fertilidade do sêmen. O fato que o plasma seminal não acompanha o espermatozóide durante sua ascensão para o sítio da fertilização no trato reprodutivo feminino sugere que sua remoção é necessária para a aquisição da capacidade de fertilização e pode ser um importante fator no processo de capacitação (MAXWELL e JOHNSON, 1999 citado por BRAZ, 2003).

Por essa razão a remoção do plasma seminal (por centrifugação ou diluição) é uma pratica comum durante a manipulação do sêmen para preservação, sendo considerada crítica garantindo a máxima viabilidade espermática, mas esse efeito pode variar dependendo da presença, ausência ou concentração critica de certos componentes (RODRIGUEZ-MARTINEZ et al., 2005).

2.1.2 Viabilidade e morfologia espermática

Para que o espermatozóide exerça sua função deve estar qualitativamente viável e potencialmente fértil, para isso a morfologia, atividade metabólica e membrana plasmática precisam está adequadas. A presença de uma membrana íntegra é um pré requisito ao processo de fertilização. Uma importante indicação das alterações que ocorrem nessa estrutura é a mudança da permeabilidade dessa membrana, ocorrendo um aumento da permebeabilidade para corantes (JOHNSON et al., 2000).

O exame de morfologia espermática faz parte da avaliação qualitativa do ejaculado e permite a determinação da freqüência de cada uma das anormalidades espermáticas e do percentual total de alterações na amostra do sêmen armazenado. È utilizado como indicativo de potencial fecundante do ejaculado, pois as alterações interferem na capacidade de movimentação e fecundação do espermatozóide de acordo com o local do defeito.

O exame morfológico é uma ferramenta para o descarte do ejaculado e até mesmo do reprodutor e deve ser efetuado em todos os reprodutores do plantel periodicamente, sempre

que um macho for introduzido, quando houver queda da motilidade dentre outras coisas. Um alto percentual de alterações morfológicas pode indicar problemas durante a espermatogênese, no trânsito espermático, na maturação do epidídimo ou durante o processamento do sêmen. Para o sêmen ser considerado normal, as alterações morfológicas totais devem ser inferiores a 20% (BORTOLOZZO et al., 2005).

As alterações na morfologia espermática podem ser classificadas de acordo com sua origem ou localização. As anormalidades estruturais dos espermatozóides podem afetar isoladamente ou simultaneamente as diferentes partes que o formam: cabeça, colo, peça intermediária e parte da cauda. Segundo HAFEZ et al. (2004) as anormalidades podem ser :

- Primárias: que são devido a falhas na espermatogênese;
- Secundária: que ocorre durante a passagem dos espermatozóides pelo epidídimo;
- Terciária: exógena ou externas que se produzem durante a ejaculação, depois desta ou por manipulação inadequada da amostra.

2.2 Tecnologia do sêmen suíno

2.2.1 Inseminação artificial

A I.A é definida como o ato de depositar por meios instrumentais o sêmen no sistema genital da fêmea, em condições que favoreçam os espermatozóides encontrar o oócito e fecundá-lo. É assim, uma técnica que permite a aceleração dos benefícios advindos do melhoramento genético, já que o patrimônio genético dos melhores machos pode ser utilizado de forma mais eficiente se difundindo para um maior número de fêmeas (BRAZ, 2003).

A I.A tem mostrado grande viabilidade em seu emprego comercial em diversas espécies incluindo, bovino, suíno, ovelha e búfalo (SUKHATO et al., 2001). Na espécie suína, a primeira IA, com sêmen resfriado foi realizada por volta da década de 30, na Rússia, e sua evolução ocorreu de forma lenta e gradativa (JOHNSON, 2000).

No Brasil, os relatos sobre a utilização dessa técnica para essa espécie, datam do final da década de 40, mas essas primeiras tentativas estavam restritas a um plano experimental. Somente na década de 70, é que foram implantados os primeiros programas comerciais, restritos a região Sul (BORTOLOZZO e WENTZ, 1997).

Um dos objetivos da I.A é potencializar a concepção com um menor volume e um número reduzido de espermatozóides e sua meta é obter células suficientes para a junção útero-tubária, para que seja estabelecido um adequado e funcional reservatório espermático no istmo do oviducto (RATH, 2002).

Dessa forma, a I.A surge como uma alternativa para melhorar a eficiência reprodutiva, trazendo como vantagem a redução do número de machos necessários para atender o plantel, a redução dos custos com cobertura, a potencialização do uso de machos geneticamente superiores, a obtenção de uma maior segurança sanitária e a eliminação dos ejaculados considerados impróprios entre outros (CORRÊA et al., 2001).

A utilização dessa técnica tem permitido ainda, a administração de volume de sêmen por volta de 80 – 100 ml, valor menor ao utilizado na monta natural (MN) que gira em torna de 300 ml. Além disso, a dose inseminante contendo cerca de 3×10^{9} de espermatozóides tem substituído com êxito o número de espermatozóides depositados no trato genital da fêmea durante a M.N, que chega a ser de 50 a 70 $\times 10^{9}$ de espermatozóides, permitindo assim um melhor aproveitamento do ejaculado.

Mesmo com inúmeras vantagens, a utilização da I.A está limitada por fatores como o curto tempo de armazenamento da dose inseminante, além de outros fatores relacionados à logística como o transporte das doses entre a central produtora e a granja nos casos de centrais abertas e estrutura laboratorial mínima (BORTOLOZZO et al., 2005).

Mesmo assim, já se percebe um aumento significativo do emprego da I.A no rebanho nacional (SCHEID, 1991). Em 1990, apenas 2% do rebanho do país era inseminado artificialmente e nos últimos anos, estima-se que o mercado nacional insemina cerca de 50% do plantel (CORREA et al., 2001) sendo ainda, bastante inferior a dos países europeus onde estima-se que essa biotecnologia alcança 80% (JOHNSON et al., 2000).

Considerando a necessidade de alternativas para a inseminação artificial suína, desenvolvimento de técnicas e soluções que permitam a utilização do sêmen dessa espécie, atualmente, estudos são desenvolvidos para permitir uma melhor utilização do sêmen.

2.2.2 Aspectos fisiológicos do transporte espermático

Para compreender as novas estratégias de IA é importante compreender os aspectos fisiológicos de transporte do espermatozóide, que é um mecanismo complexo que envolve atividades e secreções do trato genital feminino, hormônios e fatores imunogenéticos dentre outros (RATH, 2002).

Após duas horas da deposição do sêmen no canal cervical, a maioria dos espermatozóides é eliminada do útero com exceção de uma pequena subpopulação de células que são transportadas rapidamente pela contração do miométrio através do corpo do útero e corno uterino para a junção útero-tubárica no oviduto, onde são estocados.

Na junção útero-tubária, assim como na parte distal do istmo do oviducto é feito o reservatório espermático, este por sua vez, é um importante local para manter a viabilidade e integridade espermática por um período de 24 a 42 horas, além de preparar o espermatozóide seletivamente para sua migração final para fertilizar o oócito no oviducto (RATH, 2002).

Enquanto estão no reservatório, o metabolismo e motilidade espermática reduzem significativamente. Uma vez ocorrida a ovulação, eles são liberados e transportados para a junção da ampola e istmo, onde a fertilização ocorrerá(POPWELL et al., 2004).

Na monta natural (MN), um volume de aproximadamente 300 ml de sêmen, contendo cerca de 60 x 10^9 espermatozóides é depositado no trato genital feminino, mais especificamente na cérviz. Esse grande volume facilita o deslocamento de parte do ejaculado para a região da junção útero-tubária (STEVERINK et al., 1998).

A partir daí e após 15 a 20 minutos, apenas um pequeno número de espermatozóides, favorecido pela contração uterina, alcança a porção caudal de 1-2 centímetros do istmo oviductal e estabelece nessa região um reservatório, isso porque essa região oferece condições favoráveis de estocagem sem que esses espermatozóides perda a habilidade de fecundar (BEHAN e WATSON, 2006).

Vale destacar, que aproximadamente 25-30% do número de espermatozóides depositados e 70% do volume são perdidos (RATH, 2002), de forma que cerca de 90% dos espermatozóides não podem ser recuperados do útero 2 horas depois da inseminação, sendo que apenas $1x10^5$ espermatozóides alcançam a junção útero-tubária e cerca de $1x10^3$ espermatozóides alcançam o reservatório espermático na porção caudal do istmo (MARTINEZ et al., 2001).

Essa diminuição do volume e do número de espermatozóides no trato genital feminino, ainda nas primeiras horas após a deposição, ocorre como conseqüência do processo de defesa do organismo em relação ao material estranho depositado, mas também pode ser causada por adesão as células ciliares do endométrio e pela migração no útero (RATH, 2002).

Os espermatozóides que não alcançam o reservatório são eliminados principalmente por refluxo de sêmen e por intensa fagocitose por leucócitos que invadem o útero 24hs após a deposição com o objetivo de preparar o local para receber o embrião (MARTINEZ et al., 2001). Todas essas perdas de sêmen são os principais motivos da redução do número de células que chegam ao local da fecundação (STEVERINK et al. 1998).

Em suínos, a perda por refluxo fica em torno de 70% do volume e 3,4% do número de espermatozóides durante a I.A e 25% do volume e 1,4% do número de espermatozóides após a inseminação (STEVERINK et al., 1998). Apesar desses valores elevados, o refluxo é considerado um evento fisiológico que não tem influência negativa no estabelecimento do reservatório espermático, de forma que não prejudica o desempenho reprodutivo (RATH, 2002). Porém se o número de espermatozóides inseminado for menor que 1 x 10^9 em 10 ml, o refluxo pode torná-se mais expressivo e afetar a taxa de fertilização (STEVERINK et al., 1998).

Algo semelhante também acontece quando os animais são inseminados artificialmente usando dose com volume de 80 a 100 ml contendo 2,5 a 4x10^9 espermatozóides (KRUGER e RATH, 2000).

2.2.3 Técnicas de inseminação artificial

Devido à crescente utilização da I.A em rebanhos de interesse comercial, tanto no nosso país como no mundo, surge a necessidade de compreendermos e conhecermos as principais técnicas de inseminação artificial utilizadas atualmente.

Em suínos podem-se realizar dois tipos de inseminações que são denominadas transcervical ou tradicional e intra-uterina. Na primeira, são utilizados aproximadamente 3 x10^9 de espermatozóides diluídos em cerca de 100 ml, que são infundidos na cérviz com auxílio de uma pipeta, que simula a extremidade do pênis do suíno. A pipeta encaixar-se na cérviz e o sêmen que pode ser fresco, resfriado ou congelado é então depositado no trato genital da fêmea (BORTOLOZZO et al., 2005).

A dose inseminante resfriada, a usualmente utilizada, pode ser armazenada por até três dias à temperatura de 15 °C a 18 °C (BORTOLOZZO et al., 2005) e a inseminação pode ser repetida duas a três vezes durante o estro, podendo totalizar 12 bilhões de espermatozóides (RATH, 2002). A necessidade de grande volume e número de espermatozóides na dose inseminante deve-se às características anatômicas da cérviz e dos cornos uterinos da fêmea suína (WATSON e BEHAN, 2002).

Já a inseminação artificial intra-uterina (IAIU), é uma técnica mais recente que permite a deposição do sêmen em uma posição pós-cervical, diretamente no corpo uterino, ao contrário da deposição intra-cervical tradicional. O corpo uterino está localizado entre a cérviz e os cornos uterinos e tem aproximadamente 3-6 cm de comprimento (MARTINEZ et al., 2002).

As células são depositadas cerca de 20 cm mais profundamente no trato reprodutivo da fêmea por meio de um cateter com diâmetro aproximado de 3 mm, que é introduzido pelo interior da pipeta tradicional. Para a realização da IAIU, após a fixação da pipeta na cérviz, o cateter é introduzido lentamente, ultrapassando a cérviz, sendo os espermatozóides depositados diretamente em um dos cornos uterinos e precisam transpor os cornos uterinos (MARTINEZ et al., 2002).

Com esta técnica é possível reduzir o volume em até 10 vezes e o número de espermatozóides na dose inseminante em 20 a 60 vezes, assim como o número de barreiras mecânicas durante o trânsito do espermatozóide até o oviducto, o que contribui para a diminuição das perdas espermáticas, em comparação com a inseminação artificial intra-cervical (IAIC). Conseqüentemente, a IAIU pode ser realizada com menores concentrações de espermatozóides (sptz) por dose.

Outro método de IA é a inseminação intra-uterina profunda (IIUP), aqui, o sêmen é depositado no terço final de um corno uterino (aproximadamente 25cm da junção útero-tubárica), pela inserção de um endoscópio de fibra óptica flexível (MARTINEZ et al., 2001) ou por um cateter secundário menos dispendioso, flexível, mas sem o endoscópio de fibra óptica guiado por um cateter modificado (MARTINEZ et al., 2002).

O cateter flexível é inserido dentro de uma pipeta de inseminação espiralada, ultrapassa os anéis cervicais e progride para um dos cornos uterinos tão próximos a junção útero-tubárica quanto possível (ROCA et al., 2003).

Pesquisas mostraram que quando o espermatozóide é depositado perto da junção útero-tubárica de um corno, este se torna capaz de alcançar o oviduto ipcelateral e fertilizar os ovócitos. As taxas de parto após a IIUP não apresentaram diferença da observada após a IAT com $3x10^9$ sptz/ml. O tamanho da leitegada também foi similar entre a IIUP e IAT (MARTINEZ et al., 2002).

Porém, essa nova tecnologia tem algumas limitações como a necessidade de maior treinamento que a tradicional, aumento dos gastos no procedimento devido ao cateter, necessidade de empregar uma tecnologia de alta precisão na contagem do número de espermatozóides por dose, dificuldade de inseminar leitoas e algumas primíparas devido à anatomia desses animais, aumento dos riscos de lesão na cérviz ou corno uterino e alto grau de higienização (MARTINEZ et al., 2001).

Vale ressaltar, que a IAIU foi primeira realizada de forma cirúrgica, mais se trata de um procedimento caro, inviável para a utilização sob condições de campo e ainda pode causar injúria

no trato reprodutivo da fêmea, surgindo então, a IAIU não cirúrgica como uma alternativa, mas que como supramencionado ainda são muitas as limitações que inviabilizam seu uso.

2.2.4 Dose inseminante

O número de espermatozóides por dose inseminante é um ponto crítico para o sucesso da I.A e nos últimos anos, vários trabalhos têm demonstrado que o número mínimo de espermatozóides por dose está relacionado com o local de depósito do mesmo no trato genital feminino (KRUGER e RATH, 2000), porém os pesquisadores estão tentando aperfeiçoar a técnica de inseminação para que seja possível utilizar um reduzido número de células espermáticas em um menor volume, sem que isso influencie negativamente as taxas reprodutivas.

Dessa forma, a redução do número de espermatozóides por dose inseminante tem sido um dos principais focos da pesquisa na suinocultura. Mesmo ainda estando em fase experimental, caso sua utilização seja viabilizada, essa técnica torna-se uma importante ferramenta para a otimização da I.A em suínos (BORTOLOZZO et al., 2005).

Com a redução da concentração espermática na DI, torna-se possível a produção de 2 a 3 vezes mais doses por ejaculado, o que implica na menor necessidade de machos no plantel e diminuição do trabalho no setor de coleta. Por outro lado, aumenta a importância das análises laboratoriais e a necessidade de realizar exame morfológico das células espermáticas com uma maior freqüência (BORTOLOZZO et al., 2005).

Em 1998, STEVERINK utilizando a I.A tradicional na espécie suína percebeu que apenas quando as fêmeas eram inseminadas com $1x10^9$ apresentavam efeitos negativos sobre a taxa de fertilização Por outro lado, a utilização de $2x10^9$ de espermatozóides/dose mostrou resultados semelhantes aquela inseminação com 3 $x10^9$ de espermatozóides/dose.

O autor notou no caso supramencionado, que a utilização de $1x10^9$ de espermatozóide/dose levou a queda da fertilidade, o que sugere que essa quantia quando depositada na região posterior da cérviz é insuficiente para alcançar a junção útero-tubária e subseqüentemente o istmo do oviducto em contraste os valores demonstrados com a inseminação profunda no corpo do útero.

Assim, a redução de $3x10^9$ para $1x10^9$ de espermatozóides/dose, ou valores inferiores a este, na IA tradicional em suínos, pode ser desvantajosa, isso porque grande parte do volume inseminado é perdida do útero por refluxo (cerca de 70% do volume contendo 25% do numero de espermatozóides da D.I). Embora o refluxo de sêmen possa ser um processo fisiológico normal, quando as fêmeas são inseminadas com 1,0 x 10^9, o refluxo passa a ter efeito negativo.

BENNEMANN et al. (2000) indicaram uma dose mínima de $1,5x10^9$ espermatozóides/ml por meio de IAT para alcançar uma taxa aceitável de concepção. Entretanto, MARTINEZ et al. (2002), mostraram que quando os espermatozóides são depositados diretamente no corno uterino ou próximo a junção tubária, o número pode ser reduzido ainda mais sem que haja prejuízo para a fertilidade, porém esses métodos requerem cirurgia ou manipulação para a penetração no corno uterino o que pode causar ou potencializar injúrias (WATSON e BEHAN, 2002).

MARTINEZ et al. (2002), realizaram com sucesso a IAIU utilizando um endoscópio, driblando assim a complexa anatomia da cérviz da fêmea alcançando taxa de 87-89% de prenhez e 9,4 a 9,8% de leitões nascidos usando $5x10^7$ espermatozóides em 10ml. Posteriormente em 2002, utilizando a IAIU não cirúrgica demonstraram ser possível obter taxa normal de concepção e tamanho de leitegada com doses contendo $5x10^7$ espermatozóides.

Com isso, o sêmen era depositado de forma não cirúrgica no corpo uterino, o que diminuía o número de barreiras durante o transito do espermatozóide até o oviducto, reduzindo assim as perdas espermáticas em comparação com a IA tradicional (MARTINEZ et al., 2002).

WATSON e BEHAN (2002), confirmando os resultados de MARTINEZ et al. (2001) demonstraram que o depósito intra-uterino, de forma não cirúrgico de dose com $1x10^9$ de espermatozóides em volume de 50-60 ml leva a resultados semelhantes ao encontrado na I.A tradicional com 2 a 3 x 10^9 e ainda com a vantagem da redução de 25-30% no volume de diluidor consumido pela central.

O benefício da inseminação no corpo do útero é que nesse sítio, as contrações uterinas são mais seguramente estabelecidas facilitando o transporte do sêmen para a junção útero-tubária, além disso, um maior número de espermatozóides é transportado e alcançam o reservatório espermático (RATH, 2002).

Com essa tecnologia é possível reduzir o número de células/dose em um menor volume algo em torno de 2 - $1x10^9$ espermatozóides/dose (MARTINEZ et al., 2002), o que corresponde a 1/3 do total de células empregadas na IA tradicional. Também podendo ser vantajosa com o sêmen congelado/descongelado (RATH, 2002) que atualmente é feito com $5\text{-}6x10^9$ em 80-100 ml (ROCA et al., 2003).

Mesmo tendo sido bem sucedido o desempenho reprodutivo de fêmeas suínas quando se utilizou a redução do número de espermatozóides/dose por meio da IAIU cirúrgica ou não, a aplicação dessa técnica ainda apresenta algumas limitações como a necessidade de alta precisão na contagem das células, dificuldade de inseminação de algumas fêmeas devido a anatomia que

dificulta a inseminação através da cerviz e também de mão de obra qualificada (MARTINEZ et al., 2001).

2.2.5 Conservação do sêmen

A manutenção do sêmen suíno sob condições de refrigeração é uma técnica eficaz para a difusão do material genético por meio dos programas de IA. Quando o ejaculado é processado de forma adequada é possível obter resultados de prenhez e tamanho de leitegada semelhante aos obtidos na monta natural (BORTOLLOZO et al., 2005).

A estocagem de sêmen diluído a baixas temperaturas tem sido um método utilizado para prolongar a viabilidade dos espermatozóides ejaculados devido ao seu efeito de desaceleração dos processos metabólicos celulares, prolongando a viabilidade espermática pela redução do consumo de energia e formação de bioproduto.

Mas para permitir a sobrevivência *in vitro* é necessário ainda a adição de elementos químicos disponíveis na forma de diluidores que agem aumentando o volume do sêmen, protegendo o sêmen contra choque térmico, mantendo o pH, fornecendo substancias necessárias ao metabolismo dos espermatozóides e inibindo crescimento bacteriano (CORREA et al., 2001).

Para cumprir essas funções, os diluidores contêm basicamente: nutrientes para as células espermáticas como glicose, antibióticos, tampões como citrato de sódio para prevenir alterações de pH que podem ocorrer à medida que se acumulam produtos metabólicos e que os nutrientes do sêmen e do diluente são utilizados pelos espermatozóides (CORREA et al., 2001). Assim a função básica do diluidor é prolongar a viabilidade dos espermatozóides, fornecendo-lhes nutrientes e substancias crioprotetoras ou fatores de resistência.

Existem basicamente dois grupos de diluidores e estes grupos são determinados pela capacidade de conservação do sêmen, sendo classificado em diluentes de curta ou longa duração (REIS, 1997). A escolha do diluidor deve considerar condições especificas em que a IA ocorre, ou seja, se o sêmen se destina ao uso imediato ou ao armazenamento durante alguns dias, se as doses serão utilizadas na mesma unidade onde foram preparadas ou empregadas em outra central (BORTOLLOZO et al., 2005).

Os diluidores de curta duração apresentam composição simples geralmente são compostos apenas por produtos salinos como glicose, citrato de sódio, bicarbonato de sódio e cloreto de potássio. Esses diluidores têm a capacidade de preservar a viabilidade do sêmen por aproximadamente 4 dias, já os diluidores classificados como de longa duração apresentam

composição mais complexa e tem custo superior. Em média tem a capacidade de preservar as células por até 7 dias.

Várias formulações de diluentes foram testadas e usadas com sêmen de cachaço, considerando-se índice de prenhez e tamanho de leitegada. Contudo foram encontrados resultados consistentes com o uso de BTS o qual apenas número limitado de ingredientes, de baixo custo, parecendo ser favorito na IA e na estocagem do sêmen diluído durante um número limitado de dias (VASCONCELOS et al., 2001).

2.2.6 Fatores que influenciam na qualidade da dose inseminante

Independente do diluidor utilizado, o sêmen diluído tem uma vida relativamente curta, pois gradativamente os espermatozóides consomem os nutrientes disponíveis no diluidor, pois a temperatura de armazenamento entre 15 e 18 °C não interrompe totalmente o metabolismo dos espermatozóides, que continuam produzindo metabólitos os quais se acumulam e interfere na motilidade espermática, além disso, essa temperatura não impede multiplicação bacteriana a qual pode afetar a qualidade espermática (HOU et al., 2002).

Conseqüentemente, quanto maior for o tempo de armazenamento do sêmen, menor será a sua fertilidade, já que há um prejuízo de motilidade e um aumento dos danos da membrana, relacionados à estocagem e alterações na permeabilidade da membrana e a liberação de substancias intracelular (CORREA et al., 2001 e HOU et al., 2002). Durante a estocagem da DI, uma redução no potencial de fertilidade devido ao envelhecimento espermático não pode ser evitada, porém, manejo, diluição e estocagem podem ser melhoradas para minimizar a diminuição no potencial de fertilidade (BOE-HANSEN et al., 2005).

Outro fator que pode interferir no período de conservação e viabilidade da célula espermática reduzindo a sua fertilidade é a taxa de diluição. Considera-se uma taxa de diluição (sêmen: diluidor) boa de 1:10 ou ente 1:5 e 1:15. Entretanto essa vai depender da concentração espermática do ejaculado a ser diluído. DI cuja taxa de diluição é pequena, menor que 1:5 apresenta baixa viabilidade espermática devido a carência de substratos energéticos e a perda da capacidade tamponante do meio (BORTOLOZZO et al., 2005).

ALEXOPOULOS et al. (1996) citado por HAUGAN et al. (2007), observaram decréscimo significativo na motilidade espermática de DI com menor diluição ($5x10^9$ sptz/DI) quando comparado com maior taxa de diluição ($1x10^9$ e $3x10^9$ sptz/DI). Os autores atribuíram o fato ao pobre ambiente metabólico gerado nas doses com taxa de diluição menores.

Já a razão pela qual ocorre uma redução da fertilidade e viabilidade espermática das D.I s submetidas a uma alta taxa de diluição (1:15) não é conhecida, mas acredita-se que a diluição excessiva anule a função do plasma seminal e de seus constituintes, os quais são requeridos para a função normal do espermatozóide (ALEXOPOULOS et al., 1996 citado por HAUGAN et al., 2007).

2.2.7 Avaliação objetiva da qualidade espermática

A motilidade espermática é comumente apontada como uma das mais importantes características associadas com a habilidade do espermatozóide fertilizar (COX et al., 2006), porém, quando mensurada microscopicamente, não é bem correlacionada com a fertilização *in vivo* ou *in vitro*, pois além do erro humano durante a avaliação subjetiva desse parâmetro, existe ainda a limitação do método para avaliar detalhadamente as características do movimento espermático (LIU et al., 1991).

Tradicionalmente, a quantificação da qualidade espermática tem sido baseada na avaliação subjetiva, usando estimativa visual de parâmetros como motilidade massal e individual. Porém, estudos relatam existir uma variação de 30 a 60% na estimativa desses parâmetros devido à limitação do ser humano em quantificar as diferentes subpopulações espermáticas na amostra (AMANN e HAMMERSTEDT, 1980; VERSTEGEN e IGUER-OUADA, 2002).

Entretanto, nos últimos anos, os sistemas de avaliação automática, CASA (Computer Assisted Sperm Analysis), tem mostrado ser uma ferramenta útil na avaliação das propriedades kinemáticas do espermatozóide individual do ejaculado, mostrando grande potencial para predizer a fertilidade do macho, por meio da correlação da velocidade de natação do espermatozóide com a fertilização de oócito *in vitro* e *in vivo* (COX et al., 2006).

O CASA é então definido como um sistema automático (hardware e software) utilizado para visualizar, digitalizar e analisar imagens sucessivas de espermatozóides, fornecendo informações acuradas, precisas e significativa do movimento individual de cada célula bem como de subpopulações de células espermáticas (AMANN e KATZ, 2004).

Para análise propriamente dita, primeiro a imagem dos campos do microscópio é enviada da câmera e convertida em imagem digital, para formar um filme, seqüência de diversas imagens digitais. Após a aquisição das imagens de diferentes campos, os vídeos seqüenciais capturados da suspensão de espermatozóides são automaticamente analisados campo a campo (MORTIMER, 2000).

O software busca em cada campo, reconhece as células e desenha de cada espermatozóide uma completa seqüência do movimento para reconstituir a trajetória percorrida pelo espermatozóide, classificando-o conforme os padrões definidos como: móvel não progressivo, linear, lento, linear rápido e imóvel (MORTIMER, 2000).

Em seguida uma série de valores do aspecto de motilidade é calculada fornecendo parâmetros de motilidade como: porcentagem de móveis, VCL (velocidade curvilínea), VAP (velocidade média da trajetória), VSL (velocidade linear progressiva), STR (retilinearidade) e LIN (linearidade). Esses valores são usados para diferenciar os padrões do movimento espermáticos (MORTIMER, 2000).

De acordo com BOYER et al. (1989) e VERSTENGEN et al. (2002) os parâmetros comumente obtidos por meio da CASA são: velocidade curvilinear (VCL), velocidade média da trajetória (VAP), velocidade linear progressiva (VSL), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH), freqüência de batimento cruzado (BCF), retilinearidade (STR), linearidade (LIN), oscilação (WOB) (vide Quadro 1; Figura 1).

Quadro 1. Parâmetros da motilidade espermática obtidos por meio do CASA

Parâmetros	Sigla	Unidade	Descrição
Velocidade curvilinear	VCL	μm/s	Velocidade da trajetória real do espermatozóide
Velocidade média da trajetória	VAP	μm/s	Velocidade da trajetória média do espermatozóide
Velocidade linear	VSL	μm/s	Velocidade em função da linha reta estabelecida entre o primeiro e último ponto da trajetória do espermatozóide
Linearidade	LIN	%	Relação percentual entre VSL e VCL
Retilinearidade	STR	%	Relação percentual entre VSL e VAP
Index de oscilação	OSC	%	Relação percentual entre VAP e VCL
Amplitude de deslocamento lateral da cabeça	ALH	μm	Deslocamento médio da cabeça do espermatozóide em sua trajetória real
Freqüência de batimento cruzado	BCF	Hz	Freqüência que a cabeça do espermatozóide atravessa a trajetória média

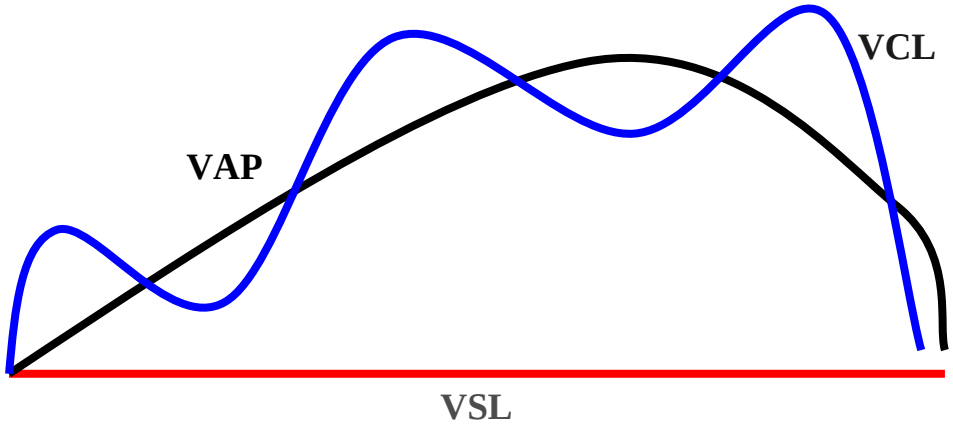

Figura 1. Velocidades obtidas pelo sistema CASA. VAP: velocidade média da trajetória; VCL: velocidade curvilinear; VSL: velocidade linear progressiva.Fonte: (BOYER et al., 1989;VERSTENGEN et al., 2002).

Na tentativa de correlacionar os parâmetros do CASA com a taxa de fertilização, verificou-se que os valores de VAP, VSL e VCL são significativamente maiores em amostras que produzem mais de 50% de oócito fertilizados do que naquelas em que a taxa de fertilização de oócito é menor que 50% (VERSTEGEN et al., 2002), comprovando que amostras com elevados valores de VAP, VCL, VSL, LIN e BCF apresentam melhor migração e penetração no muco cervical (MORTIMER, 2000; VERSTEGEN et al., 2002). Além disso, parâmetros como BCF e LIN têm revelado correlação positiva com a taxa de prenhez em alguns estudos (VERSTEGEN et al., 2002).

3 JUSTIFICATIVA

Segundo Bortolozzo e Wentz, 1997, no nordeste brasileiro, mesmo existindo um bom número de criadores, o que constatamos é que a criação de suínos ainda não encontra bem desenvolvida em comparação com outras regiões, sendo especificamente nas granjas do Ceará, a tecnificação muito baixo, o que tem contribuído para o lento desenvolvimento desta criação na região.

A necessidade de se encontrar alternativas para melhorar a função produtiva e reprodutiva de animais domésticos de interesse econômicos como suínos tem estimulado pesquisadores de todo o mundo a desenvolver biotecnias que permitam a eficiência máxima de animais de alto padrão genético.

A utilização da redução do número total de espermatozóides da dose inseminante parece ser a solução para a adoção da inseminação artificial pelos pequenos produtores, pois a dose de sêmen, principalmente a importada é dispendiosa. Além disso, também possibilitará inseminar um efetivo maior de fêmeas otimizando, desde modo, o uso de ejaculados de machos nos rebanhos e possibilitará ainda uma maior economia da quantidade de diluidor consumido o que pode ser direcionada a aquisição de diluentes de maior qualidade e maior período de armazenamento.

4 HIPÓTESE CIENTÍFICA

É possível reduzir o número de espermatozóides por dose inseminante na inseminação artificial tradicional sem alterar o desempenho reprodutivo das fêmeas suínas.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

- Determinar o número total mínimo de espermatozóides de espermatozóides por dose inseminante para a utilização na inseminação artificial tradicional.

5.2 Objetivos específicos

- Avaliar *in vitro* o efeito do número decrescente de espermatozóides na dose inseminante;
- Avaliar *in vivo* as taxas de fertilidade e prolificidade com a redução do número total de espermatozóides na dose inseminante.

6 CAPÍTULO 1

Análise computadorizada de sêmen: revisão

Computer-assisted sperm analysis (CASA): A REVIEW

Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (Submetido em junho de 2008)

ANALISE COMPUTARIZADA DE SÊMEN: REVISÃO

Computer-assisted sperm analysis (CASA): A REVIEW

DL *Matos*[1*], AA *Araújo*[1], IG *Roberto*[1], R *Toniolli*[1].

[1]Programa de pós-graduação em ciências veterinárias – FAVET/UECE
Universidade Estadual do Ceará, Campus do Itaperi, Av. Paranjana, 1700,
CEP: 60700-000, Fortaleza-CE
Correspondência: dadamatos@hotmail.com.br

Resumo

A avaliação da motilidade espermática e morfologia são essenciais na análise da qualidade do sêmen. A análise desses parâmetros tem sido baseada na avaliação subjetiva, resultando em variações de até 60%. Para reduzir a subjetividade, sistemas automáticos de análise seminal (CASA) vêm sendo desenvolvidos fornecendo confiabilidade e velocidade de obtenção dos dados, mas seu uso é limitado devido à necessidade de validação dos dados, controle de qualidade e padronização das análises. A uniformização desse instrumento permitirá comparação de resultados e fornecerá subsídios para melhorar as biotécnias da reprodução. Diante de sua importância, faremos uma breve revisão do conhecimento dessa tecnologia, abordando o funcionamento, as vantagens e aplicações do CASA.

Palavras-chaves: Análise computadorizada de sêmen, Motilidade espermática, Morfologia espermática

Abstract

The assessment of sperm motility and morphology are essential for examination of sperm quality. The analysis of these parameters has been based on subjective evaluation, resulting in variations of up to 60%. To reduce the subjectivity, automated systems analysis of seminal (CASA) have been developed providing reliability and speed for semen analysis, but its use is limited due the need of validation of data, quality control and standardization. The uniformity of this instrument will allow comparison of results and provide allowance to improve the biotechnologies of reproduction. In view of its importance, we will make a brief review of the knowledge of this method, approaching its function, benefits and applications.

Key-words: Computer-assisted sperm analysis (CASA), sperm motility, sperm morphology

INTRODUÇÃO

A análise da motilidade espermática e morfologia têm sido apontadas por muitos autores como importante ferramenta na seleção de um ejaculado, sendo a determinação da porcentagem de espermatozóides móveis, o teste mais utilizado para predizer a qualidade seminal (VERSTEGEN e IGUER-OUADA, 2002).

Tradicionalmente, a quantificação da qualidade espermática tem sido baseada na avaliação subjetiva, usando estimativa visual de parâmetros como motilidade massal e individual, contudo, estudos relatam existir uma variação de 30 a 60% na estimativa desses parâmetros devido à limitação do ser humano em quantificar as diferentes subpopulações espermáticas na amostra (AMANN e HAMMERSTEDT, 1980; VERSTEGEN e IGUER-OUADA, 2002).

Para reduzir a subjetividade, nos últimos 15 anos, sistemas automáticos para análise computadorizada de sêmen (CASA) vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de fornecer dados acurados da motilidade de cada espermatozóide e resumo estatístico das subpopulações (VERSTEGEN e IGUER-OUADA, 2002). Podendo ainda ser utilizados para mensurar o número de células por unidade de volume e ser modificado para capturar dados aproximados para classificação morfométrica de cada célula examinada (AMANN e KATZ, 2004).

Os diferentes instrumentos CASA têm demonstrado altos níveis de precisão e confiança usando diferentes classificações metodológicas que fornecem uma grande ferramenta para melhorar nosso conhecimento e habilidade para manipular espermatozóides (VERSTEGEN e IGUER-OUADA, 2002). Tornando-se essencial à pesquisa, treinamento pessoal e padronização entre laboratórios (AMANN e HAMMERSTEDT, 1980).

Diante da sua importância, faremos aqui, uma breve revisão do estado atual do conhecimento da tecnologia CASA, abordando seu funcionamento, aplicações, vantagens, limitações e impactos na biologia espermática e clínica.

Histórico

No início da década de 40, estudiosos tiveram a necessidade de obter dados objetivos na porcentagem de espermatozóides móveis e informações sobre a velocidade do movimento dessas células. Acreditavam que se fossem obtidos dados precisos do movimento espermático, seria possível predizer o potencial de fertilidade de um macho ou

selecionar o melhor procedimento para preparação do espermatozóide (AMANN e KATZ, 2004).

Entre os vários métodos de avaliação idealizados, Lord Rothschild, ainda na década de 40, introduziu o uso de fotografias em tempo real, usando iluminação de campo escuro para criar imagens da trajetória do movimento do espermatozóide e manualmente, determinar a velocidade de deslocamento (VERSTEGEN e IGUER-OUADA, 2002; AMANN e KATZ, 2004).

Esse sistema, assim como outros desenvolvidos na mesma época, era incapaz de mensurar a velocidade individual das células, o que só foi possível a partir de 1978, quando surgiu o primeiro sistema automático capaz de avaliar a trajetória do movimento espermático baseado na avaliação individual (VERSTEGEN e IGUER-OUADA, 2002; AMANN e KATZ, 2004).

Vale ressaltar que o pioneiro Expert Vision® desenvolvido pela Motion Analysis Corporation, Santa Rosa, Califórnia, mais tarde chamado Cell Track®, não era um sistema específico para esse tipo de análise (AMANN e KATZ, 2004).

O primeiro sistema CASA para comercialização desenvolvido especificamente para avaliação da motilidade espermática foi o CellSoft® (CRYO Resources, Montgomery, New York) comercializado por volta de 1985 para uso em laboratório de pesquisa e laboratórios médicos (MACK et. al.,1988). Em 1986, surgiu o HTM 2000® Hamilton-Thorn Research, Beverly, Massachusetts, também desenvolvido especificamente para esse tipo de análise (AMANN e KATZ, 2004).

Em 1992, apresentou-se o HTM-IVOS Sperm Analyzer®, um sistema integrado de computador e microscópio que permitia a aquisição de imagens digitalizadas, fornecendo classificação automática dos movimentos espermáticos, informando porcentagem de móveis, média de velocidade e porcentagem de progressivos (IGUER-OUADA e VERSTEGEN, 2001).

Atualmente a HTM disponibiliza versões como HTM-IVOS 10® e HTM-CEROS 12.1®. A versão HTM-IVOS 10® é proposta para avaliação do sêmen humano, mas já foi validado para a espécie canina. A versão HTM-CEROS 12.1® permite ainda avaliar morfologia e morfometria espermática canina (IGUER-OUADA e VERSTEGEN, 2001). Atualmente, em adição ao HTM, existem outros sistemas comerciais de CASA em uso como o SM-CMA®(Stromberg-Muka Band Feilnback, Germany) (DAVIS e KATZ, 1993).

Independente do fabricante, os diferentes instrumentos são baseados em princípios similares, mas diferem em termos de ótica usada e software para identificação do espermatozóide e construção da trajetória (KRAEMER et al., 1998).

Nos últimos anos, relatos utilizando esse sistema têm aumentado significativamente, e a principal espécie no qual tem sido utilizado é a humana, principalmente em centros de fertilidade para avaliação da qualidade espermática antes da aplicação de biotécnica da reprodução e para fazer correlação da qualidade espermática (morfologia e motilidade) com a fertilidade (VERSTEGEN e IGUER-OUADA, 2002).

Em medicina veterinária, o CASA ainda não é uma prática rotineira. Embora já seja verificada sua validação em várias espécies como bovina, suína e eqüina, esse sistema ainda não está inteiramente padronizado para todas as espécies de animais (VERSTEGEN e IGUER-OUADA,2002).

Definição

O CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) é um sistema automático (hardware e software) utilizado para visualizar, digitalizar e analisar imagens sucessivas de espermatozóides, fornecendo informações acuradas, precisas e significativa do movimento individual de cada célula bem como de subpopulações de células espermáticas (AMANN e KATZ, 2004).

Aplicações do sistema CASA

O CASA tem demonstrado ser uma ferramenta útil no monitoramento da qualidade espermática de amostras submetidas a diferentes tratamentos e durante estudos metabólicos e toxicológicos no macho ou no esperma (FARREL et.al., 1996), na pesquisa de novos diluidores seminais, crioprotetores ou outros tipos de processamento(AMANN e KATZ, 2004).

É também valioso na quantificação da hiperativação, no estabelecimento da relação entre qualidade do sêmen do doador e a verdadeira fertilidade da amostra e nas avaliações gerais da conveniência do uso de machos para reprodução (FARREL et.al., 1996; VERSTEGEN e IGUER-OUADA, 2002).

Vantagens x desvantagens

O sistema é adequado para quantificar um grande número de células com padrão de motilidade heterogêneo em um curto período de tempo (MACK et. al.,1988; FARREL et.al., 1996), fornecendo dados de concentração de espermatozóides/ml, morfologia, motilidade e velocidade, detectando mudanças sutís nos parâmetros sob várias condições experimentais (KRAEMER et.al., 1998).

Além da execução do exame, o sistema permite a catalogação de pacientes num banco de dados, assim como, o armazenamento de informações relevantes, criando um ambiente de trabalho caracterizado pela confiabilidade, versatilidade, facilidade de manuseio e de configuração, velocidade de obtenção de resultados e catalogação, permitindo que seja atingido alto nível de automação em laboratórios, clínicas, empresas e universidades.

Resultados significativos têm sido obtidos em pesquisas básicas o que não teria sido possível sem a tecnologia CASA. Embora o sistema tenha muitas vantagens ele apresenta algumas desvantagens que torna seu uso limitado (VERSTEGEN e IGUER-OUADA, 2002) o elevado custo do equipamento, a necessidade de validação, controle de qualidade e padronização das avaliações realizadas (DAVIS e KATZ, 1993).

F**uncionamento do CASA**

No método de análise seminal computadorizada, a avaliação de motilidade em seus diversos parâmetros é realizada rigorosamente por um sistema estroboscópico de alta precisão totalmente controlado por computador. Utiliza-se vídeomicrografia que faz o monitoramento constante e análise seqüencial do movimento do espermatozóide (MORTIMER, 2000).

Embora seja o flagelo a parte do espermatozóide que causa motilidade, os sistemas automáticos consideram como a cabeça está se movimentando, porque é tecnicamente mais fácil acompanhar o movimento da cabeça do que do flagelo (MORTIMER, 2000).

Isso porque, a freqüência do batimento flagelar é muito alta, (acima de 80 batimentos por segundo para espermatozóide humano lavado) sendo então necessário pelo menos 200 observações por segundo para mensurar o padrão do batimento flagelar corretamente. Atualmente, os sistemas de vídeo analisam 25-60 imagens/s, ou seja, usam uma menor freqüência que é incompatível para avaliação do batimento flagelar, impossibilitando a

aquisição de boas imagens (MORTIMER, 2000). Já a cabeça não se move tão rapidamente como a cauda o que possibilita a obtenção de imagens relativamente claras utilizando a tecnologia de vídeo convencional. (MORTIMER, 2000).

Por meio do uso de microscópio com contraste de fase, as células espermáticas são visualizadas mais claras que o meio onde elas se encontram o que permitirá a detecção e rastreamento dessas células. O processo de detecção automática das células, denominado segmentação, é então realizado pelo sistema comparando a intensidade da imagem adquirida com um limiar de intensidade pré-estabelecido (MORTIMER, 2000).

Existe um intervalo, fornecendo o tamanho mínimo e máximo aceitável para a cabeça do espermatozóide de cada espécie, o computador irá reconhecer um objeto que cair dentro da taxa esperada como cabeça espermática. Pedaços da imagem com intensidade abaixo deste limiar serão considerados parte do fundo (MORTIMER, 2000).

Análise

Para análise propriamente dita, primeiro a imagem dos campos do microscópio é enviada da câmera e convertida em imagem digital, para formar um filme, ou seja, seqüência de diversas imagens digitais. Após a aquisição das imagens de diferentes campos, os vídeos seqüênciais capturados da suspensão de espermatozóides são automaticamente analisados campo a campo (MORTIMER, 2000).

O software reconhece as células e desenha de cada espermatozóide uma completa seqüência do movimento para reconstituir a trajetória percorrida pelo espermatozóide, classificando-o conforme os padrões definidos como: móvel não progressivo, linear, lento, linear rápido e imóvel (MORTIMER, 2000).

Em seguida, uma série de valores do aspecto de motilidade é calculada fornecendo parâmetros de motilidade como: porcentagem de móveis, VCL (velocidade curvilínea), VAP (velocidade média da trajetória), VSL (velocidade linear progressiva), STR (retilinearidade) e LIN (linearidade). Estes valores são usados para diferenciar os padrões do movimento espermáticos (MORTIMER, 2000).

Quando o CASA é usado, todos os espermatozóides em um campo de visão e suas trajetórias são reconstruídas simultaneamente. Todas as células espermáticas de um campo são identificadas antes que a próxima imagem na seqüência seja analisada.

Parâmetros da motilidade espermática avaliados pelo CASA

De acordo com Verstegen e Iguer-Ouada, (2002) os parâmetros reportados pelo CASA são:VCL, VAP, VSL, ALH, BCF, STR e LIN.

Velocidade curvilínea (VCL- µm/s): É a velocidade da trajetória real do espermatozóide. È sempre a maior das três velocidades e serve como elemento de cálculo para a linearidade (MORTIMER, 2000).

Velocidade média da trajetória (VAP- µm/s): É a velocidade da trajetória média do espermatozóide. Em casos onde a trajetória da cabeça espermática é muito regular e linear com pouco movimento lateral da cabeça, a VAP é quase a mesma VSL, porém com trajetórias irregulares, não lineares ou onde existe um alto grau de movimento lateral, a VAP será maior que VSL (MORTIMER, 2000).

Velocidade linear progressiva (VSL- µm/s): É a velocidade média em função da linha reta estabelecida entre o primeiro e o último ponto da trajetória do espermatozóide. È sempre a mais baixa das três velocidades (MORTIMER, 2000).

Amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH - µm): É a amplitude do deslocamento médio da cabeça do espermatozóide em sua trajetória real. A mensuração desse parâmetro esta relacionada com a capacidade de penetração na zona pelúcida do óvulo, assim, a ALH é um dos parâmetros que tem efeito sobre a fertilização *in vitro* (MORTIMER, 2000).

Freqüência de batimento flagelar cruzado (BCF- Hz): É o número de vezes que a cabeça do espermatozóide cruza a direção do movimento. Se existe mais batimento/sec que imagens/sec então a BCF irá ser subestimada (MORTIMER, 2000).

Retilinearidade (STR-%): É a relação percentual entre VSL e VAP. Estima a proximidade do percurso da célula a uma linha reta.

Linearidade (LIN - %): Relação percentual entre VSL e VCL, ou seja, é a porcentagem de célula que tem index linear > 0.7, ângulo absoluto menor que 25° e ângulo algébrico menor que 3° C. Quanto mais o espermatozóide se afasta da velocidade em linha reta, menor será sua linearidade (MORTIMER, 2000).

Os valores de velocidade são determinados como percurso relevante percorrido em um período e são representados em µm/s enquanto os valores de LIN, e STR são determinados como raio dos valores de velocidade.

Avaliação da hiperativação espermática

A hiperativação é um processo que o espermatozóide apresenta durante o seu progresso no oviducto da fêmea, sendo descrito como um movimento vigoroso, não progressivo, não linear e está relacionado com o processo de capacitação e fertilização (VERSTEGENS e IGUER-OUADA, 2002).

Durante a hiperativação, o padrão e o vigor da trajetória do espermatozóide são alterados passando a ser caracterizados por uma larga amplitude de o batimento flagelar, aumento médio do movimento lateral da cabeça e cauda do espermatozóide associados também com uma motilidade lenta ou não progressiva de baixa freqüência de batimento flagelar (MORTIMER e MORTIMER, 1990; SUAREZ, 1996; KAY e ROBERTSON, 1998; VERSTEGENS e IGUER-OUADA, 2002).

A mensuração objetiva desse processo fisiológico pode ser usada como biomarcador não apenas na predição da fertilidade, mas também na avaliação de agentes farmacológicos administrados para tratar infertilidade masculina e monitorar o efeito dos contraceptivos na função espermática (KAY e ROBERTSON, 1998).

A avaliação da hiperatividade do espermatozóide utilizando o sistema CASA é possível a partir do uso de alta freqüência. O uso de 60Hz permitiu melhor discriminação entre motilidade progressiva e motilidade hiperativada quando comparada a análises feitas a 30Hz (MORTIMER e SWAN, 1995 citado por CANCEL et.al., 2000).

O uso da alta freqüência combinado como aumento da resolução do sistema óptico e de computadores melhores tornou eficiente o registro da trajetória dos espermatozóides com alta velocidade e trajetória irregular que até então eram difíceis de ser analisados (CANCEL et. al.,2000).

Em sêmen humano, é caracterizado como espermatozóide hiperativado aquele que apresenta: VCL$\geq$ 70µm/s, ALH$\geq$ 7µm, LIN$\leq$ 30% e VSL $\leq$ 30 µm(MORTIMER e MORTIMER, 1990; VERSTEGENS e IGUER-OUADA, 2002).

Avaliação da morfometria

A classificação da morfológia do espermatozóide tem tornado-se uma parte integral da rotina da análise de sêmen. A razão disso é que a morfologia espermática é um importante indicador de fertilidade tanto em homens como em animais, além de ser bom

indicador para danos espermáticos conseqüentes de agentes físicos ou químicos (VERSTEGENS e IGUER-OUADA, 2002; GARCIA-HERREROS et., al. 2006).

Segundo Hirai et.,al. (2001), a análise automática da morfometria espermática tem sido aplicada em varias espécies incluindo bovino (GRAVANCE et. al.,1996b) caprino(GRAVANCE et., al., 1995), ovino(GRAVANCE et. al., 1998a), suíno(SCHMIAT, 1997) e humanos(DAVIS e KATZ, 1993).

Esses sistemas são programados para classificar objetos e diferenciar imagens das células espermáticas de detrito seminal e/ou superposição de células, medindo parâmetros como diâmetro máximo, diâmetro mínimo, área da cabeça, porcentagem de acrossoma (obtido dividindo área do acrossoma pela área da cabeça) e fator de elipse (obtido dividindo o diâmetro mínimo pelo máximo), que serão utilizados para classificar as células segundo sua forma em: normal (formato de cabeça oval), afilada, redonda, macro, micro ou amorfo (cabeça irregular).

Mesmo sendo avaliação objetiva, o sistema CASA apresenta variação entre 11 e 23%, o que pode ser atribuída a fatores como preparação da amostra incluindo técnica de fixação e técnica de coloração, bem como fatores como correta iluminação, foco, aumento, sistema de classificação, interpretação e experiência do profissional (HIRAI et al.,2001; VERSTEGENS e IGUER-OUADA, 2002).

Casa e avaliação da fertilidade

A habilidade do espermatozóide para migrar através do trato reprodutivo da fêmea e penetrar no oócito depende da resistência exercida pela secreção presente no trato genital feminino e do potencial hidrodinâmico conferido pela curvatura flagelar. Sua força de propulsão é definida pelas propriedades cinemáticas dessas células, o que pode levar a diferente eficiência de migração entre espermatozóide de alguns machos (COX et al., 2006).

A motilidade espermática é comumente apontada como uma das mais importantes características associadas com a habilidade fertilizante do espermatozóide (COX et. al., 2006), porém, quando mensurada microscopicamente, não é bem correlacionada com a fertilização *in vivo* ou *in vitro*, pois além do erro humano durante a avaliação subjetiva desse parâmetro, existe ainda a limitação do método para avaliar detalhadamente as características do movimento espermático (LIU et al., 1991).

Nos últimos anos, o sistema de avaliação automática têm mostrado ser uma ferramenta útil na avaliação das propriedades cinemáticas do espermatozóide individual do

ejaculado, mostrando grande potencial para predizer a fertilidade do macho, por meio da correlação da velocidade de natação do espermatozóide com a fertilização de oócito *in vitro e in vivo* (COX et al., 2006).

Na tentativa de correlacionar os parâmetros do CASA com a taxa de fertilização, verificou-se que os valores de VAP, VSL e VCL são significativamente maiores em amostras que produzem mais de 50% de oócito fertilizados do que naquelas onde a taxa de fertilização de oócito é menor que 50% (VERSTEGENS e IGUER-OUADA, 2002), comprovando que amostras com elevados valores de VAP, VCL, VSL, LIN e BCF apresentam melhor migração e penetração no muco cervical (MORTIMER, 2000; VERSTEGENS e IGUER-OUADA, 2002).

Entretanto, entre os parâmetros cinemáticos fornecidos pelo CASA, VCL e ALH têm mostrado grande correlação com taxa de fertilização pela maioria dos estudos. Parâmetros como BCF e LIN têm revelado correlação positiva com a taxa de prenhez em alguns estudos, mas correlação negativa em outros (VERSTEGENS e IGUER-OUADA, 2002).

Espermatozóides humanos com boa capacidade de penetração no muco cervical apresentam um grupo de propriedades cinemáticas semelhantes a: VAP± 25µm/s e ALH± 4,5µm(MORTIMER, 2002), enquanto, em caprinos, espermatozóides com velocidade eficiente na migração do muco cervical *in vitro* apresentam LIN> 50% e ALH = 4,8 µm(COX et al., 2006).

Outro parâmetro preditivo de fertilidade é a porcentagem de espermatozóides móveis. Em varrões com leitegada maior que 10, foi observado alta porcentagem de espermatozóide móveis, cerca de 93%, enquanto que em varrões com tamanho de leitegada menor, a porcentagem de espermatozóide móveis registrada foi em torno de 80% (HIRAI et al., 2001).

Fatores que influenciam a análise automática

Vários fatores podem gerar uma variabilidade na estimativa dos parâmetros das características do sêmen mensurados pelo CASA, entre os quais pode-se citar: experiência do observador, identificação da espécie, acurácia da câmara utilizada, número de alíquotas, campos e amostras utilizadas, temperatura de análise, tempo entre amostra e análise, método de processamento da amostra, instrumento usado, concentração espermática e freqüência de aquisição(DAVIS e KATZ, 1993; FARREL et al., 1996; MORTIMER, 2000).

Experiência do observador

È importante que o observador seja treinado e experiente para reconhecer e desconsiderar dados de velocidade de movimento resultante de alterações momentâneas que porventura possam ocorrer (VERSTEGEN e IGUER-OUADA, 2002).

Identificação da espécie

O sistema apresenta uma configuração diferente para cada espécie, assim o primeiro passo é fazer a identificação correta da espécie e da amostra (VERSTEGEN e IGUER-OUADA, 2002).

Acurácia da câmara utilizada

A profundidade da câmara pode afetar a estimativa da concentração ou influenciar a expressão de motilidade por restringir o deslocamento ou por levar à interações das células com as paredes da câmara (VERSTEGEN e IGUER-OUADA, 2002). Assim, ela deve ser profunda o suficiente para que o padrão de motilidade seja avaliado (KAY e ROBERTSON, 1998).

Diferentes resultados foram observados com a diferença de profundidade da câmara (LIU, 1991). Makler (1978b) citado por Amann e Hammerstedt (1980) verificou que a percentagem de espermatozóides humanos com motilidade progressiva e sua velocidade aumentam quando a espessura da suspensão espermática aumenta de 2µm, 8 µm e 10 µm, mas nenhuma mudança é detectada quando a espessura é de 20 µm, determinando-se, que profundidades maiores de 20 µm não trazem benefícios para análise de amostras com motilidade padrão (ESHRE 1998).

Número de campos e amostras analisadas

De acordo com Verstegen e Iguer-Ouada, (2002) a precisão dos resultados aumenta quando o número de campos e células analisados também aumenta. Chegaram a essa afirmação quando observaram que, em geral, um maior número de variações é verificado de análises resultante de campos diferentes, o mesmo não ocorrendo no caso de repetidas análises de alguns campos.

Temperatura de análise

A temperatura influencia negativamente a motilidade do espermatozóide, baseados nisso, estudos em diferentes espécies foram realizados para determinar qual a temperatura ideal para se realizar as análises no sistema CASA, sendo recomendado por vários autores, a temperatura corporal de 37 e 38°C, (VERSTEGEN e IGUER-OUADA, 2002).

Efeito da concentração

A concentração espermática também tem influência nos resultados do CASA. Estudos com o sêmen humano e o sêmen animal têm demonstrado que o sistema CASA não é eficaz para avaliações de amostras espermáticas com alta ou baixa concentração, assim, para uma correta análise, a concentração espermática deve estar entre 20 a 50 $x10^6$ (BUDWORTH et.al., 1987; DAVIS e KATZ, 1993).

Efeito da diluição e diluidores

O efeito das soluções de rediluição sobre os parâmetros de cinética tem sido pouco estudado, mas tem sido demonstrado afetar a análise de motilidade. (FARREL et.al., 1996). Por exemplo, gotículas de lipídeos da gema de ovo podem ser contadas se estas possuírem a mesma dimensão da cabeça de um espermatozóide.

Efeito do tempo

Com relação à influência do tempo de incubação, FARREL et al., (1996), verificou o declínio na velocidade espermática durante incubação de 2 horas, registrando redução de 3-6% na porcentagem de espermatozóides móveis em amostras de sêmen humano e de camundongo. O mesmo foi observado em sêmen resfriado de bovino (TARDIF et al., 1997) e de suíno (HOLT et.al.,1997) estocado por 3 dias.

Efeito da freqüência de aquisição

Segundo Mortimer et al. (1988), citado por Kraemer et al. (1998), a freqüência de aquisição de imagens também é importante. Foi demonstrado que a reconstrução da trajetória pode ser influenciada pelo número de imagens capturadas por segundo, assim, algumas trajetórias podem parecer simples quando reconstituídas a 30 imagens/segundo, mas complexas quando reconstituídas a 60 imagens/segundo (MORTIMER, 2000). Isso ocorre porque o aumento da freqüência de captura de imagens resulta em mais informações da trajetória afetando o aspecto do movimento espermático.

Davis e Katz (1993) demonstraram que em baixa freqüência de aquisição, erros nos valores médios de ALH, LIN, VCL e BCF eram de 0.9, 57, 33 e 33% respectivamente, mas quando aumentada para 60 Hz os erros eram reduzidos para 0.05, 11, 9,5 e 8.9% respectivamente, assim, uma melhora significativa na acurácia das avaliações foi encontrada quando a freqüência de aquisição foi aumentada de 30 para 60Hz.

Mortimer e Swan, (1995) citado por Cancel et al., (2000), o uso de 60Hz, permite uma melhor discriminação entre a motilidade progressiva e motilidade hiperativada em espermatozóide humano quando comparado a análises feitas a 30Hz.

Métodos de processamento

Processos como lavagem, capacitação, congelação, descongelação, diluição e resfriamento têm efeito substancial sobre os parâmetros analisados. Tardif et al. (1997) verificou o aumento do deslocamento lateral da cabeça espermática após resfriamento do sêmen bovino. Mack et al. (1988), verificou melhora em todos os parâmetros cinemáticos, exceto LIN, após lavagem do sêmen humano.

Em estudo comparando análises de sêmen fresco e descongelado, mostrou não existir diferente significativa em relação dos dados de ALH. BCF, STR e LIN, após criopreservação, mas verificou queda da motilidade total de 93% para 51% e da motilidade progressiva de 64 para 21% após descongelação.

Controle de qualidade e validação

Para que ocorra o desenvolvimento dessa tecnologia e seja possível comparação, interpretação e reprodução de resultados, muitos autores têm mencionado a necessidade da padronização de procedimentos para manipulação de sêmen, embora várias modificações no procedimento sejam necessárias para diferentes espécies, os princípios para as avaliações da qualidade espermática utilizando o CASA são similares (FARREL et al., 1996).

Em geral para a determinação automática do movimento espermático as mesmas recomendações são sugeridas para todas as espécies de mamíferos:

As amostras de sêmen com concentrações maiores do que a recomendada pelo fabricante devem ser diluídas a concentrações entre 20-50x 10^6/ml, mas diluidores a base de leite ou gema de ovo, que contem partículas com tamanho similar a cabeça do espermatozóide devem ser evitados, porque não são diferenciadas dos espermatozóides imóveis (VERSTEGENS e IGUER-OUADA, 2002).

Todas as análises devem ser realizadas a temperatura fisiológica de cada espécie, a câmara deve ter profundidade adequada, com no mínimo 10µm de profundidade e avaliações básicas de sêmen podem ser feitas a 30Hz, mas as amostras com espermatozóides mais rápidos devem ser avaliadas a 60Hz (DAVIS e KATZ, 1993; ESHRE, 1998).

Após a análise, o usuário deve verificar se todos os espermatozóides móveis no campo de visão tiveram sua trajetória reconstruída e comparar a análise automática com a manual (ESHRE, 1998; VERSTEGENS e IGUER-OUADA, 2002). Mesmo com essas recomendações gerais, até que seja desenvolvido um apropriado procedimento de controle

de qualidade e métodos de calibração do instrumento CASA, a comparação de resultados entre laboratórios será limitada (DAVIS e KATZ, 1993).

CONCLUSÃO

Nos últimos anos, tem sido rápido o desenvolvimento de equipamentos e procedimentos para facilitar a análise automatizada do sêmen. O CASA permitiu uma mensuração objetiva de diferentes características da célula espermática, mostrando alto nível de precisão e segurança, sendo atualmente utilizado como uma ferramenta para melhorar nosso conhecimento e habilidade para manipular espermatozóides, abolindo a subjetividade das análises feito pelo olho humano.

A futura uniformização e padronização desse instrumento darão a oportunidade de analisar objetivamente resultados de motilidade e morfometria espermática, definindo universalmente valores aceitos como normais, dando subsídio para melhorar a aplicação das biotecnias da reprodução.

REFERÊNCIAS

AMANN, R e KATZ, D.F. Reflections on CASA after 25 years. **Journal of Andrology**, Durham, v. 25, n.3, p. 317-325, 2004.

AMANN, R.P. e HAMMERSTEDT. Validation of a system for computerized mensurements of spermatozoal velocity and percentage of motile sperm. **Biology of reproduction,** Pennsylvania, v.23, p. 6478-645, 1980.

BUDWORTH, P.R,; AMMANN, R.P. e HAMERSTED, R.H. A microcomputer photographic method for evaluation of motility and velocity in bull sperm. **Jounal Dairy Science**, v.70, p.1927-1936, 1987.

CANCEL, A.; LOBDELL, D.; MENDOLO, P. e PERREAULT, D. Objective avaliation of hyperactivated motility in rat spermatozoa using computer-assisted sperm analysis. **Human Reproduction**, USA, v.15, n.6, p.1322-1328, 2000.

COX, J.F.; ALFARO, V.; MONTENEGRO, V. e RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. **Theriogenology,** Chile, **v.**66, p, 860-867, 2006.

DAVIS, R.O. e KATZ, D.F. Operational Standards for CASA Instruments. **Journal of Andrology**, California, v.14, n.5, p. 385-395, 1993.

ESHRE, Andrology Special Interest Group. Guidelines on the application of CASA technology in the analysis of spermatozoa. **Human Reproduction,** Belgium, v**.**13, p. 142-145, 1998.

FARREL, P.B.; FOOTE, R.N.; McARDLE, M.M.; TROUERN-TREND, V.L. e TARDIF, A.L; Media and dilution procedures tested to minimize handling effects on human, rabbit and bull sperm for computer-assisted sperm analysis(CASA). **Journal of Andrology**, New York, v.17, p.293-300, 1996.

GARCIA-HERREROS, M.; APARICIO, I.M.; BARON, F.J.; GARCIA MARTIN, L.J. e GIL.M.C. Standardization of samples preparation, staining and sampling methodos for automated sperm head morphmetry analysis of boar spermatozoa. **International Journal of Andrology**, Spain, v.29, p.553-563, 2006.

HIRAI, M.; BOERSMA, A.; HOEFLICH, A.; WOLF, E.; FOLL,J.; AUMULLER. R. e BRAUM. J. Objectively measured sperm motility and sperm head morphometry in boars (*Sus scrofa*): Relation to fertility and seminal plasma growth factors. **Journal of Andrology**, Germany, v.22, n.1, p.104-110, 2001.

HOLT, C.; HOLT, W.; MOORE, H.D.M.; REED, H.C.B e CURNOCK, R.M. Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: results of two fertility trial. **Journal of Andrology**, London, v.18, n.3, p. 312-323, 1997.

IGUER-OUADA. M. e VERSTEGEN, J. Evaluation of the Hamilton-Thorn computer based automated system for dog sêmen analysis. **Theriogenology**, v.55, p. 733 – 749, 2001.

LIU, D.Y.; CLARKE, G.N e BAKER, W.G. Relationship between sperm motility assessed with the Hamilton-Thorn motility analyzer and fertilization rates *in vitro*. **Journal of Andrology,** Australia, v.12, n.4, p. 231-239, 1991.

KAY, V.J e ROBERTSON, L. Hyperactivated motility of human spermatozoa: a review of physiological functions and application in assisted reproduction. **Human Reproduction, UK, v.**4, n.6, p. 776-786, 1998.

KRAEMER, M.; FILLION, C.; MARTIN-PONT, B. e AUGER, J. Factors influencing human sperm Kinematic measuring by the celltrak computer-assisted sperm Analysis System. **Human reproduction**, Paris, v.13, p.611– 619, 1998.

MACK, S.O.; WOLF, D.F e TASH, J.S. Quantitation of specific parameters of motility in large numbers of human sperm by digital image processing. **Biology of Reproduction**, Texas, v.38, p.270-281, 1988.

MORALES, P.; KATZ, D.F.; OVERSTREET, J.W.; SAMUELS, S.J e CHANG, R.J. The relationship between the motility and morphology of spermatozoa in human semen. **Journal of Andrology,** California, v.9, n.4, p. 241-248, 1988.

MORTIMER, S.T. Casa- Practical aspects- **Journal of Andrology**, Vancouver, p.515-524, 2000.

MORTIMER, S.T e MORTIMER, D. Kinematics of human spermatozoa incubated under capacitating conditions. **Journal of Andrology**, Canada, v.11, n.3, p.195-203, 1990.

O'CONNOR, M.T.; AMANN. R.P. e SAACKE. R.G. Comparisons of computer evaluations of spermatozoal motility with standard laboratory test and their use for prediciting fertility. **Journal of Animal Science**, v.53, n.3, p. 1368-1375, 1981.

ROBERTSON, L., WOLF, D.P. e TASH, J.S., Temporal changes in motility parameters related to acrossomal status: Identification and characterization of population of hyperactivated human sperm. **Biology of Reproduction**, v.39. p.797-803, 1988.

SUAREZ, S.S. Hyperactivated motility in sperm. **Journal of Andrology** Ithaca, v.17, n.4, p.331-334, 1996.

TARDIF, A.L.; FARREL, P.B.; TROUERN-TREND, V. e FOOTE, R.H. Computer-assisted sperm analysis for assessing initial semen quality and changes during storage at 5ºC. **Journal of Dairy Science**, Ithaca, v.80, p. 1606-1612, 1997.

24- VERSTEGEN, J; IGUER-OUADA, M e ONCLIN, K. Computer assisted sêmen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, vol.57, p. 149 - 179, 2002.

Agradecimentos

Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pelo suporte financeiro.

7 CAPÍTULO 2

Sobrevivência espermática em diferentes taxas de diluição do sêmen do varrão

(Spermatic survival at differents dilutions taxes in the swine semen)

Revista Brasileira de Produção e Saúde Animal (Submetido em outubro de 2008)

Sobrevivência espermática em diferentes taxas de diluição do sêmen do varrão

(Spermatic survival at differents dilutions taxes in the swine semen)

MATOS, Darlete Lima[1] ARAUJO, Airton Alencar de[2]; TONIOLLI, Ricardo[2]; ROBERTO, Iara Gonçalves[1];

[1]*Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinária/UECE*

[2]*Faculdade de Veterinária – Universidade Estadual do Ceará*

RESUMO

O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito do número de espermatozóides 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 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 3,5 x10^9 sptz apresentaram a maior sobrevivência espermática e parâmetros de motilidade compatíveis aos padrões de qualidade exigidos para uso na IA. Baseado nos resultados *in vitro* 90 fêmeas foram inseminadas, dividas em três grupos: 30 fêmeas com 3,5 x10^9 sptz usando pipeta Goldenpig; 30 fêmeas com 2 x10^9 sptz e 30 com 3,5 x10^9 sptz usando pipeta Goldengilt. Não houve diferenças significativas nas taxas de parição quando comparadas as DI de 2 e 3,5 x10^9 sptz. Concluiu-se que uma redução limitada do número de espermatozóides 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

This work aimed 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 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 each 24 hours for the CASA automatic. The doses of 2 and 3 x10^9

sptz showed *in vitro* the better results of survival and sperm motility. Based on *in vitro* results, 30 sows were inseminated with 3.5 x10^9 sptz using pipette Goldenpig, 30 females inseminated with 2 x10^9 sptz and 30 females inseminated with 3.5 x10^9 sptz with pipette Goldengilt. There was no difference in fertility rates when compared the ID of 2 and 3.5 x10^9 sptz (93% for all doses). In conclusion, the limited reduction of the number of sperm in the ID does not affect fertility rates allowing to inseminate a greater number of sows.

Key words: Boar semen, artificial insemination, inseminating dose

INTRODUÇÃO

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 potencialização do uso de machos geneticamente superiores. Na espécie suína, os primeiros relatos do uso da IA datam de 1932 na antiga URSS e desde então se tem registrado um constante aumento de sua aplicação em todo o mundo (Bortollozo e 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 espermatozóides 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 x10^9 espermatozóides em um volume entre 80 a 100 ml de diluente tem sido recomendado para alcançar o máximo de fertilidade, tanto na IA convencional quanto na intra-cervical. Um grande volume e número de espermatozóides por dose inseminante são necessários, devido às características anatômicas da cérviz e dos cornos uterinos da fêmea suína (Steverink et al., 1998; Watson e 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 cérviz (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 espermatozóides depositados próximo à junção útero tubária, sendo relatado inseminações intra-uterinas profundas (IIUP) bem sucedidas com 200 a 500 milhões e/ou 1 bilhão de espermatozóides em um volume de 10 ml (Martinez et al., 2002). Krueger e Rath (2000), relataram resultados satisfatórios, sem decréscimo no potencial de fertilização com deposição cirúrgica de 1 $x10^7$ sptz em 0,5 ml. 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 utilizando um reduzido número de espermatozóides, 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 espermatozóides em doses de sêmen utilizadas na IA de fêmeas suínas.

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) 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 2 Kg/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 500 ml, previamente aquecido a 37 °C, coberto com gaze e protegido em copo isotérmico. Após separação da fração gelatinosa o ejaculado foi avaliado quanto ao volume (ml), concentração ($x10^6$ sptz/ml), temperatura (°C), total de células ($x10^9$ sptz), vigor espermático (0 a 5 – Toniolli, 1996) e motilidade espermática (%). Para as análises do vigor e da motilidade espermática, foram utilizadas alíquotas de 10 µl 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 ≥ 80% foram utilizados no experimento. Após esta análise, o sêmen de cada macho foi diluído a uma temperatura entre 32 a 34° C no Beltsville Thawing Solution (BTS), utilizando-se dois volumes finais diferentes para

as dose de sêmen, com um número total de espermatozóide de 1 x10^9 sptz, 2 x10^9 sptz em 80 ml e 3,5 x10^9 sptz em 100 ml (controle), sendo envazados em garrafinhas plásticas.

O sêmen diluído e envazado foi transportado até o LRSTS 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, onde as amostras foram mantidas sob resfrigeração entre 15 e 17 °C por 3 dias. Os parâmetros de motilidade foram avaliados nos dias D0 (dia da coleta, 6 hs após processamento), D1, D2 e D3 (último dia de conservação).

A cada dia de análise foi retirado um volume de 5 ml de cada amostra, sendo reaquecida por 5 minutos a 37 °C. Uma gota de 10 µl foi colocada em câmara de Makler, previamente aquecida, com 10 mm de profundidade sendo a motilidade espermática analisada pelo o sistema CASA (SCA Microptic S.L., Barcelona, Espanha). Nesta análise, examinaram-se cinco imagens digitalizadas consecutivas obtidas de campos diferentes usando objetiva de 20x e contraste de fase, sendo avaliados os parâmetros de velocidade média da trajetória dos espermatozóides (VAP, µm/s), linearidade (LIN, %) e porcentagem de móveis (%). As células com velocidade abaixo de 10 µm/s foram consideradas como imóveis, até 25 µm/s como de movimento local e acima de 25 µm/s com movimento retilíneo progressivo.

De cada tratamento foi realizado um esfregaço de sêmen, a fim de se proceder a análise morfológica e de viabilidade espermática. A solução corante foi constituída por 0,1g de azul de bromofenol + 0,4 g de citrato de sódio e 10 ml de água destilada. A osmolaridade da solução foi medida e quando necessário, ajustada com água destilada para valores entre 300 e 310 mOsm. As amostras de sêmen para esfregaços foram feitas sempre após 10 minutos de incubação, preparadas no dia da coleta (D0), dois dias após (D2) e no último dia de conservação (D3) para análise morfológica. Para os exames de viabilidade espermática, os esfregaços foram feitos nos dias D0, D1 e D3. Na preparação do esfregaço juntou-se uma gota de sêmen com outra de corante a mesma temperatura e homogeneizou-se. 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 espermatozóides foram classificados em 3 categorias: espermatozóides vivos com acrossoma intacto, espermatozóides vivos com acrossoma danificado e espermatozóides mortos. Para a morfologia espermática avaliou-se problemas de cabeça, cauda, peça intermediária e presença de gota citoplasmática proximal. 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 variando de 1 a 9, distribuídas aleatoriamente entre os diferentes tratamentos. Para as IA foi utilizados o sêmen dos mesmos reprodutores da etapa anterior, sendo a coleta do ejaculado e diluição realizadas como na etapa anterior, preparando-se doses com 2 e 3,5 $x10^9$ 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 $x10^9$ sptz / 100 mL, com pipeta Goldenpig-IMV (controle); 30 fêmeas inseminadas com doses de 3,5 $x10^9$ sptz / 100 ml, com pipeta Goldengilt-IMV e 30 fêmeas inseminadas com doses de 2 $x10^9$ sptz / 80 ml, com pipeta Goldengilt-IMV. A pipeta Goldengilt, específica para leitoas, consiste de um modelo padrão de um tubo de polipropileno (7 mm), que em vez da esponja usual com extremidade de 25 mm, apresenta esponja de formato cônico reduzindo a extremidade para 17 mm, sendo um pouco mais alongada e permitindo deposição intra-cervical um pouco mais profunda, cerca de 0,5 cm (Behan e Watson, 2006).

O diagnóstico de gestação foi feito com base no não retorno ao estro, avaliado dos 18 aos 25 dias após IA. Para avaliação da capacidade fecundante das DI, foram coletados dados relativos ao número de matrizes inseminadas, número matrizes fertilizadas, número total de leitões nascidos e leitões nascidos vivos. A partir destes dados foram calculadas as taxas de não retorno ao estro, parição e leitões nascidos vivos.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa SYSTAT versão 7.0 (1997). Foram comparados os parâmetros de motilidade, de vitalidade e morfologia espermática entre tratamentos, com avaliação por ANOVA utilizando o modelo GLM (General Linear Model). Posteriormente, aplicou-se teste de Tukey para comparação entre médias dos diferentes tratamentos. Considerou-se um intervalo de confiança de 5% ($p < 0,05$). As taxas de retorno ao estro, parição e leitões nascidos vivos foram avaliadas pelo teste do Qui-quadrado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Etapa *in vitro*

A motilidade progressiva do espermatozóide é um indicativo de metabolismo normal da célula espermática e de uma membrana intacta, 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 bastante diminuída (Bortollozo et al., 2005).

Neste trabalho, o monitoramento desse parâmetro ao longo dos dias de conservação se deu de forma objetiva. Os resultados revelaram que foi significativa ($p < 0,05$) a redução da porcentagem de espermatozóides móveis assim com da VAP e LIN. As DI de 1 $x10^9$ sptz apresentaram os menores valores de células móveis (13±2,9), bem como de VAP (19±3,5) e de LIN (19±3,5). Quando comparados com os demais tratamentos, em doses de 2 $x10^9$ sptz (móveis = 30±5,0; VAP = 28±3,3 e LIN = 37±3,3) e em doses de 3,5 $x10^9$ sptz (móveis = 46±6,0; VAP = 34±2,6 e LIN = 38±2,6). Esse comportamento se repetiu ao longo dos dias de conservação do sêmen (Tabela 1).

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 deste período. Entretanto este tipo de resultados não é uma tônica e diferenças significativas tanto 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 se utilisa diferentes diluentes para o sêmen.

Tabela1: Avaliação objetiva (CASA) dos parâmetros de motilidade espermática do sêmen suíno, com diferentes totais de espermatozóides em doses inseminantes, conservadas por 72 horas.

Parâmetro		**Doses (sptz)**		
	Dia	**$1x10^9$**	**$2x10^9$**	**$3,5x10^9$**
Motilidade (%)	D0	13 ± 2,9Aa	30 ± 5,0Ab	46 ± 6,0Ac
	D1	10 ± 2,6 Aa	30 ± 4,7 Ab	45 ± 5,6 Ac
	D2	11 ± 3,9 Aa	32 ± 6,8 Ab	49 ± 6,6 Ac
	D3	6 ± 2,1 Aa	31 ± 6,8 Ab	47 ± 6,6 Ac
VAP (µm/s)	D0	19 ± 3,5 Aa	28 ± 3,3 Aa,b	34 ± 2,6 Ab
	D1	20 ± 3,2 Aa	32 ± 2,8 Ab	37 ± 1,9 Ab
	D2	14 ± 3,3 Aa	31 ± 2,8 Ab	39 ± 2,2 Ab
	D3	11 ± 2,4 Aa	30 ± 2,9 Ab	35 ± 1,6 Ab
LIN (%)	D0	19 ± 3,5 Aa	37 ± 3,3 Ab	38 ± 2,6 Ab
	D1	19 ± 3,1 Aa	32 ± 2,8 Ab	38 ± 1,9 Ab
	D2	13 ± 3,3 Aa	30 ± 2,7 Ab	37 ± 1,2 Ab
	D3	10 ± 2,4 Aa	30 ± 2,1 Ab	35 ± 1,6 Ab

a,b letras diferentes, diferenças significativas entre valores na mesma linha ($p < 0,05$).

AB letras diferentes, diferenças significativas entre valores na mesma coluna ($p < 0,05$).

Os resultados encontrados neste trabalho ficaram abaixo dos demonstrados pelos referidos autores, fato este que pode ser justificado pelas condições de transporte das DI da granja ao laboratório. Ainda assim, os achados foram consistentes, com as amostras tendo apresentado comportamento de queda ao longo da conservação semelhante aos demonstrados por Murgas et al. (2000) que obteve motilidade espermática de 70% na avaliação em 0h, 63% em 24 hs e 55% em analise com 48hs.

O fato de não ter sido significativa a diferença ao longo dos dias de conservação, pode ser explicado pela avaliação ter sido apenas até 72 hs (D3), dia ainda viável quando utilizado o BTS, um diluente de curta duração. O sêmen suíno resfriado sofre diminuição de sua qualidade com o tempo de conservação e isso se deve ao fato de que o este processo provoca danos aos espermatozóides, especialmente quando a duração é mais prolongada. Este fato ocorre independente da taxa de diluição ou condições de armazenamento do sêmen (Haugan et al., 2007).

Com o decorrer da conservação, houve um acúmulo de produtos tóxicos do metabolismo dos espermatozóides 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 espermatozóide suíno, assim, a redução dos valores de motilidade, VAP e LIN no sêmen resfriado foi 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. Esta queda dos valores (13±2,9) foi maior nas doses com menor número total de espermatozóides. Nos outros tratamentos, os resultados foram melhores conforme maior foi o número de células por DI, com 30±5,0 e o maior valor de motilidade (46±5,0), encontrado na DI com maior número de células (3,5 $x10^9$ sptz), ou seja, com a menor taxa de diluição.

Estes resultados, diferentes dos observados por vários 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 este 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, que tem como função proteger o espermatozóide contra o choque térmico, sua ação benéfica junto a preservação da qualidade do sêmen, pode estar diminuído 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 $x10^9$ sptz; de 1:9 a 1:16 (média de 1:12) nas DI de 2 $x10^9$ sptz e de 1:6 a 1:11 (média de 1:8) nas DI de 3,5 $x10^9$ sptz. Desta forma, verificou-se que nas DI com menor número de espermatozóides, aconteceu a maior taxa média de diluição do sêmen, bem como a maior variação desta taxa. A razão pelo qual ocorre uma redução da fertilidade e viabilidade espermática das DI submetidas a uma alta taxa de diluição (>1:15) não é totalmente conhecida, podendo ser a diluição do plasma seminal uma das possíveis explicações.

Ele 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; Boe-Hansen et al., 2005). A redução do volume do plasma seminal pode explicar o que se observou nas DI de 1 $x10^9$ 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 desta forma um efeito negativo sobre a sobrevivência espermática *in vitro*.

Foi observado que o período de estocagem do sêmen e número total de espermatozóide/dose tiveram um efeito negativo na vitalidade espermática. A porcentagem de células vivas com acrossoma intacto diminuiu progressivamente em todas os tratamentos, enquanto que a porcentagem de espermatozóides vivos com acrossoma danificados e espermatozóides mortos aumentaram, no decorrer do período de conservação (Tabela 2). A dose de 1 $x10^9$ sptz apresentou as menores percentagens de células viáveis durante todo o período de conservação (D0 = 85±1,1; D1 = 67±2,4 e D3 = 53±3,2) quando comparado com a dose de 2 $x10^9$ sptz (D0 = 87±1,2; D1 = 69±1,6 e D3 = 59±2,4), com diferenças significativas ($p < 0,05$) já a partir de D1. As doses de 3,5 $x10^9$ sptz (D0 = 89±0,7; D1 = 75±1,6 e D3 = 63±3,2), apresentou durante todo o período de conservação do sêmen, as

melhores porcentagens de células vivas com acrossoma intacto, em relação ao outros dois tratamentos. Com relação ao número de células mortas (D0 = 11±1,0 e D3 = 45±3,4), ele foi significativamente menor nas doses menos diluídas, de 2 $x10^9$ sptz (D0 = 10±1,2 e D3 = 36±2,3) e de 3,5 $x10^9$ sptz (D0 = 10±0,6 e D3 = 32±3,0).

Com relação ao número de espermatozóides vivos com acrossoma danificados 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 $1x10^9$; de 1% para 3,9% na DI $2x10^9$ e de 1% para 3% na DI de 3,5 $x10^9$ era esperado, uma vez que segundo alguns autores, o espermatozóides suíno mantido sob refrigeração *in vitro*, perde gradualmente seu acrossoma (Althouse et al., 1998; Hou et al., 2002).

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

Total de	**VIVO INTACTO**			**VIVO DANIFICADO**		
sptz	**D0**	**D1**	**D3**	**D0**	**D1**	**D3**
$1x10^9$	85±1,1aA	67±2,4 bA	52±3,2cA	1±0,3aA	2±0,5abA	4,2±0,7bA
$2x10^9$	87±1,2aA	69±1,6bAB	59±2,4cA	1± ,3aA	2±0,4abA	3,9±0,6bA
$3.5x10^9$	89±0,7aA	75±1,6bB	63±3,2cB	1±0,2aA	1± 0,3bA	3±0,7cA

a,b letras diferentes, diferenças significativas entre valores na mesma linha ($p < 0,05$).
AB letras diferentes, diferenças significativas entre valores na mesma coluna ($p < 0,05$).

Como a célula espermática depende de seu acrossoma para uma penetração bem sucedida da zona pelúcida, o número de espermatozóides danificados na DI poderá afetar o potencial de fertilização do espermatozóide, porém, em porcentagem baixa o aumento de alterações espermáticas não comprometerá os resultados de fertilidade (Watherhouse et al. 2004).

Estudos recentes evidenciaram o efeito negativo do tempo de estocagem sobre a morfologia espermática (Watherhouse et al., 2004), entretanto, um achado interessante nesse trabalho, foi a falta desse efeito sobre a característica morfológica do espermatozóide suíno (Tabela 3). Isso ocoreu, possivelmente, devido ao fato de que os machos utilizados eram animais selecionados de acordo com um padrão minimo 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 periodo de conservação do sêmen. Não foi evidenciado efeito do número de células/dose sobre o aparecimento de anormalidades espermáticas durante a conservação do sêmen, tendo os valores ficado dentro da faixa aceitável com anormalidades abaixo de 20%, indicando um sêmen potencialmente fértil (Hugan et al., 2007).

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

Total	**Normal**			**Anormal**		
de sptz	**D0**	**D2**	**D3**	**DO**	**D2**	**D3**
1 x 10^9	83±1,5aA	81± 1,6aA	82± 1,7aA	17±1,5aA	19±1,6aA	18± 2,0aA
2 x 10^9	83±1,3aA	80± 3,6aA	80± 2,2aA	17± 2,2aA	20± 1,2aA	20± 2,2aA
3 x 10^9	83±1,4aA	83± 1,5aA	80± 2,1aA	17± 1,3aA	17± 1,5aA	20± 1,7aA

a,b letras diferentes, diferenças significativas entre valores na mesma linha ($p < 0,05$).
AB letras diferentes, diferenças significativas entre valores na mesma coluna ($p < 0,05$).

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 cabeça globosa e piriforme, acrossoma difuso, peça intermediária dobrada na base e cauda dobrada.

Etapa *in vivo*

Na continuidade do trabalho, a dose de 1,0 x10^9 sptz foi descartada da avaliação *in vivo,* pois os resultados com uma maior redução do número de espermatozóides para 1,0 x10^9 sptz/dose teve uma influência negativa sobre a sobrevivência espermática do sêmen suíno, com resultados incompatíveis para seu uso na inseminação artificial.

Tabela 4. Resultados de fertilidade de fêmeas inseminadas com doses de sêmen apresentando diferentes totais de células por dose.

Tratamento	n	Parto (%)	Total de nascidos	Nascidos vivos
Goldenpig 3,5 x10^9sptz/100 mL	30	93,3	11,1±1,9a	10,8±1,7a
Goldengilt 3,5 x10^9sptz/100 mL	30	93,3	11,4±2,9a	10,9±2,8a
Goldengilt 2,0 x10^9sptz/80 mL	30	93,3	11,3±2,4a	10,5±2,5a

a,b letras diferentes, diferenças significativas entre valores na mesma coluna ($p < 0,05$).

As taxas de parição foram iguais (93,3%) em todos os grupos, não havendo também diferenças significativas ($p > 0,05$) entre tratamentos, quanto as outras características avaliadas: número de leitões nascidos vivos e total de nascidos (Tabela 04).

Ao comparar os resultados das DI com 3,5 x10^9 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 total de nascidos não diferiram do grupo controle (Goldenpig 3,5 x10^9 sptz/100 mL), demonstrando que o tipo de pipeta usada nas inseminaçoes não influenciou nos resultados de fetilidade.

Os resultados de fertilidade e prolificidade no presente trabalho, não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre tratamentos, na taxa de parto e tamanho de leitegada de fêmeas inseminadas, independentemente da DI utilizada.

CONCLUSÔES

Os resultados de fertilidade, indicaram que a diminuição do número de espermatozóides da DI para 2 x10^9 sptz foi possivel com adequada fecundação e sem afetar negativamente a sobrevivência espermática e o desempenho reprodutivo das fêmeas.

A redução do volume da dose inseminante proporcionará uma economia de diluente, permitindo desta forma a aquisição de produtos de maior qualidade e que possibilitem um maior período de armazenamento do sêmen. Por outro lado, a redução do número total de espermatozóides na dose, possibilitará um melhor aproveitamento do ejaculado do varrão com uma produção de doses 33% maior, o que permitirá servir um maior número de fêmeas no plantel, otimizando e racionalizando o uso de ejaculados de reprodutores suínos geneticamente superiores, bem como melhorando a relação custo x benefício.

REFERÊNCIAS

ALTHOUSE, G.C.; WILSON, M.E.; KUSTERS, C e PARSEY, M. Characterization of lower temperature storage limitations of fresh-extended porcine semen. Theriogenology, 50:535-543, 1998.

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

BOE-HANSEN,G.; ERSBOILL, A.K.; GREVE, T.; CHRISTENSEN, P. Increasing storage time of extended boar semen reduces sperm DNA integrity. **Theriogenology**, 63:2006-2019, 2005.

BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I. Inseminação artificial de suínos no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 21, p.13-15, 1997.

BORTOLOZZO,F.P.;WENTZ,I. e DALLANORA,D.” Situação atual da inseminação artificial em suinos” **Acta Scientiae Veterinariae**,33(1):17-32, 2005.

CEROLINI,S.; MALDJIAN, A.; SURAI, P.; e NOBLER, R. Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar sêmen during liquid storage. **Animal Reproduction Science,** 58:99-111, 2000.

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**, 62:874-886, 2004.

HAUGAN; T, GROHN,Y.T; KOMMISRUD, E; ROPSTAD E: REKSEN, O. “ Effects of sperm concentration at semen collection and storage period of frozen semen on dairy cow conception” **Animal Reproduction**, 97:1-11, 2007.

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**: 58:1349-1360, 2002.

JOHNSON, L.A.; WEITZE, K.F.; FISER, P.; MAXWELL, W.M.C. Storage of boar semen. Animal Reproduction Science, 62:143-172, 2000.

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

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**, 122:289-296, 2001.

MARTINEZ,E.A; VAZQUEZ,J.M; ROCA,J; GIL,M.A; PARRILA.I; VASQUEZ J.L. e DAY,B.N " Minimum number of spermatozoa required for normal fertility after deep intrauterine insemination in non-sedaded sows" **Reproduction**, 123:163-170, 2002.

MURGAS, L.D.S.; ZANGERONIMO, M.G.; SANTOS, A.G.O e OLIVEIRA, S.L. oxitocina no sêmen suíno heterospérmico resfriado a 15 °C. **Ciência Animal Brasileira**, 3(2):33-40, 2002.

STEVERIN K, D.W.B; SOEDE,N .M ; BOUWM AN , E.G; K EM P,B . "Semen bakflow after insemination an d its effect on fertilizations in sows" **Animal Reproduction Science**, 54:109-119, 1998.

SYSTAT VERSION 7.0 COPYRIGHT (C), SPSS INC, 1997.

TONIOLLI, R. Pouvoir fecondant des spermatozoïdes de verrat: amèlioration des conditions de conservation. 1996. 91p. Tese de Doctorat (Doutorado em Ciência da Vida) - Université François Rabelais de Tours, Tours, France.

TEJERINA, F.; BURANAARRINUAY, K.; SARAVIA, F.; WALLGREN, M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ-H. Assessment of motility of ejaculated, liquid-stored boar spermatozoa using computerized instruments. **Theriogenology**, 69:1129-1138, 2008.

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

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**, 62:1638-1651, 2004.

Agradecimentos

Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pelo suporte financeiro.

8 CONCLUSÕES

É possível reduzir o número de espermatozóides para $2x10^9$ por dose inseminante na inseminação artificial tradicional a 17 °C por 3 dias, sem gerar efeito negativo para a sobrevivência espermática *in vitro* e sem comprometer o desempemho reprodutivo da fêmea possibilitando a produção de 33% mais doses por ejaculado.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTHOUSE, G.C.; WILSON, M.E.; KUSTERS, C e PARSEY, M. Characterization of lower temperature storage limitations of fresh-extended porcine semen. Theriogenology, 50:535-543, 1998.

AMANN, R e KATZ, D.F. Reflections on CASA after 25 years. **Journal of Andrology**, 25(3), 2004.

AMANN, R.P. e HAMMERSTEDT. Validation of a system for computerized mensurements of spermatozoal velocity and percentage of motile sperm. **Biology of reproduction,** 23: 6478-645, 1980.

ARAUJO, A.A. Mise au point d´un diluieur de conservation en milieu liquide pour la semence ovine en vue de l´insémination artificielle, 2000,81p. Tese (Doutorado em Ciencias da Vida) université François de Tours, Tours.

BEHAN, J.R; WATSON, P.F. A field investigation of intra-cervical insemination with reduced sperm numbers in gilts. **Theriogenology**, 66. 338-343 ,2006.

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

BOE-HANSEN,G.; ERSBOILL, A.K.; GREVE, T.; CHRISTENSEN, P. Increasing storage time of extended boar semen reduces sperm DNA integrity. **Theriogenology**, 63: 2006-2019, 2005.

BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I. Inseminação artificial de suínos no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** 21, p.13-15,1997.

BORTOLOZZO,F.P.;WENTZ,I. e DALLANORA,D. Situação atual da inseminação artificial em suínos. **Acta Scientiae Veterinariae**,33(1). 17-32, 2005.

BOYER, S.P.; DAVIS, R.O.; KATZ, D.F. Automated semen analysis. **Current problems in obstetrics, gynecology and fertility**, v. 12, p. 167 – 200, 1989.

BRAZ, V.B. influencia do diluidor, da temperatura de conservação e da taxa de diluição sobre a sobrevievncia espermática in vitro do sêmen ovino resfriado. Dissertação de mestrado , PPGCV, 2003.

BUDWORTH, P.R,; AMMANN, R.P. e HAMERSTED, R.H. A microcomputer photographic method for evaluation of motility and velocity in bull sperm. **Jounal Dairy Science**, v.70, p.1927-1936, 1987.

CANCEL, A.; LOBDELL, D.; MENDOLO, P. e PERREAULT, D. Objective avaliation of hyperactivated motility in rat spermatozoa using computer-assisted sperm analysis. **Human Reproduction**, USA, v.15, n.6, p.1322-1328, 2000.

CEROLINI,S.; MALDJIAN, A.; SURAI, P.; e NOBLER, R. Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar sêmen during liquid storage. **Animal Reproduction Science,** 58:99-111, 2000.

CORREA, N.M.; MEINCKE,W.; LUCIA.T.Jr.; DESCHAMPS,C.J.; **Inseminação Artificial em Suinos,** 2001.

COX, J.F.; ALFARO, V.; MONTENEGRO, V. e RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical muçus. **Theriogenology,** 66: 860-867, 2006.

DAVIS, R.O. e KATZ, D.F. Operational Standards for CASA Instruments. **Journal of Andrology**, California, v.14, n.5, p. 385-395, 1993.

DUBE, C.; BEAULIEU, M.; REYES-MORENO, C.; GUILLEMETTE, C.; BAILEY, J.L. Boar semen storage capacity of BTS and Androhepes Plus: viability, motility, capacitation and tyrosine phosphorylation. **Theriogenology**, 62: 874-886,2004.

ESHRE, Andrology Special Interest Group. Guidelines on the application of CASA technology in the analysis of spermatozoa. **Human Reproduction,** Belgium, v.13, p. 142-145, 1998.

FARREL, P.B.; FOOTE, R.N.; McARDLE, M.M.; TROUERN-TREND, V.L. e TARDIF, A.L; Media and dilution procedures tested to minimize handling effects on human, rabbit and bull sperm for computer-assisted sperm analysis(CASA). **Journal of Andrology**, New York, v.17, p.293-300, 1996.

GARCIA-HERREROS, M.; APARICIO, I.M.; BARON, F.J.; GARCIA MARTIN, L.J. e GIL.M.C. Standardization of samples preparation, staining and sampling methodos for automated sperm head morphmetry analysis of boar spermatozoa. **International Journal of Andrology**, Spain, v.29, p.553-563, 2006.

HAFEZ, B. HAFEZ, E.S.E. Anatomia da reprodução masculina. Em: **Reprodução Animal**. Sétima edição. Barueri, SP: Manole, p. 3 – 12, 2004.

HAUGAN; T, GROHN,Y.T; KOMMISRUD, E; ROPSTAD E: REKSEN, O. " Effects of sperm concentration at semen collection and storage period of frozen semen on dairy cow conception" **Animal Reproduction**, 97, 1-11, 2007.

HIRAI, M.; BOERSMA, A.; HOEFLICH, A.; WOLF, E.; FOLL,J.; AUMULLER. R. e BRAUM. J. Objectively measured sperm motility and sperm head morphometry in boars (*Sus scrofa*): Relation to fertility and seminal plasma growth factors. **Journal of Andrology**, Germany, v.22, n.1, p.104-110, 2001.

HOLT, C.; HOLT, W.; MOORE, H.D.M.; REED, H.C.B e CURNOCK, R.M. Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: results of two fertility trial. **Journal of Andrology**, London, v.18, n.3, p. 312-323, 1997.

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**: 58: 1349-1360, 2002.

IGUER-OUADA. M. e VERSTEGEN, J. Evaluation of the Hamilton-Thorn computer based automated system for dog sêmen analysis. **Theriogenology**, 55: 733 – 749, 2001.

JOHNSON, L.A.; WEITZE, K.F.; FISER, P.; MAXWELL, W.M.C. Storage of boar semen. Animal Reproduction Science, 62: 143-172, 2000.

KAY, V.J e ROBERTSON, L. Hyperactivated motility of human spermatozoa: a review of physiological functions and application in assisted reproduction. **Human Reproduction, UK, v.**4, n.6, p. 776-786, 1998.

KRAEMER, M.; FILLION, C.; MARTIN-PONT, B. e AUGER, J. Factors influencing human sperm Kinematic measuring by the celltrak computer-assisted sperm Analysis System. **Human reproduction**, Paris, v.13, p.611– 619, 1998.

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

LIU, D.Y.; CLARKE, G.N e BAKER, W.G. Relationship between sperm motility assessed with the Hamilton-Thorn motility analyzer and fertilization rates *in vitro*. **Journal of Andrology,** Australia, v.12, n.4, p. 231-239, 1991.

MACK, S.O.; WOLF, D.F e TASH, J.S. Quantitation of specific parameters of motility in large numbers of human sperm by digital image processing. **Biology of Reproduction**,38: 270-281, 1988.

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**, 122. 289-296, 2001.

MARTINEZ,E.A; VAZQUEZ,J.M; ROCA,J; GIL,M.A; PARRILA.I; VASQUEZ J.L. e DAY,B.N " Minimum number of spermatozoa required for normal fertility after deep intrauterine insemination in non-sedaded sows" **Reproduction**, 123,.163-170,2002.

MEDEIROS, A.A.; ARAUJO,A. A. DE; MOURA, A.A.A.; CAVALCANTE, J.M.M.; FIGUEREDO, E. L. e RODRIGUES, L. F. de S. Utilização do Azul de Bromofenol conservado a 4°C e 29°C como método de coloração vital para avaliação do espermatozóide ovino. Revista Ciências Agrárias, 46(287-297), 2006.

MORTIMER, S.T. Minimun sperm trajectory length for reliable determination of the fractal dimension. **Reproduction Fertility Development** 10: 465-469, 1998.

MORTIMER, S.T. Casa- Practical aspects- **Andrology Lab. Corner**, 2002.

MORTIMER, S.T. Casa- Practical aspects- **Journal of Andrology**, p.515-524, 2000.

MURGAS, L.D.S.; ZANGERONIMO, M.G.; SANTOS, A.G.O e OLIVEIRA, S.L. Oxitocina no sêmen suíno heterospermico resfriado a 15°C. **Ciência Animal Brasileira**, 3(2):33-40, 2002.

POPWELL, J.M.; FLOWERS, W.L. Variability in relationships between sêmen quality and estimulates in vivo and invitro fertility in boar. Animal Reproduction Science, 81: 97-113, 2004.

RATH, D. Low dose insemination in the sow- a review. **Reproduction Domestic Animal**, 37. 201-205, 2002.

REIS, F.T. Colheita, avaliação e manipulação do ejaculado suíno. **Ver. Brás. Rep. Anim**. 21:(3), p.22 a 29, 1997.

ROCA, J; CARVAJAL, G; LUCAS, X, VAZQUEZ, J.M; MARTINEZ, E.A. Fertility of weaned sows after deep intrauterine insemination with a reduced number of frozen-thawed spermatozoa. **Theriogenology**, 60, 72-87, 2003.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; SARAVIA, F.; WALLGREN, M.; TIENTHAI, P.; JOHANNISSON, A.; VAZQUEZ, J.M; MARTINEZ, E.; ROCA, J.; SANZ, L e CALVETE, J.J.Boar spermatozoa in the oviduct. **Theriogenology**, 63: 514-535, 2005.

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

SYSTAT VERSION 7.0 COPYRIGHT (C), SPSS INC, 1997.

STEVERIN K, D.W.B; SOEDE,N .M ; BOUWM AN , E.G; K EM P,B . "Semen bakflow after insemination an d its effect on fertilizations in sows" **Animal Reproduction Science**, 54: 109-119,1998.

SUAREZ, S.S. Hyperactivated motility in sperm. **Journal of Andrology** Ithaca, v.17, n.4, p.331-334, 1996.

SUKHATO, P.; THONGSODSEANG, S.; UTHA, A.; SONGSASEN, N. Effects of cooling and warming conditions on post-thawed motility and fertility of cryopreserved buffalo spermatozoa. **Animal Reproduction Science** 67, p.69-77, 2001.

TARDIF, A.L.; FARREL, P.B.; TROUERN-TREND, V. e FOOTE, R.H. Computer-assisted sperm analysis for assessing initial semen quality and changes during storage at 5ºC. **Journal of Dairy Science**, Ithaca, v.80, p. 1606-1612, 1997.

TEJERINA, F.; BURANAARRINUAY, K.; SARAVIA, F.; WALLGREN, M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ-H. Assessment of motility of ejaculated, liquid-stored boar spermatozoa using computerized instruments. Theriogenology, 69:1129-1138, 2008.

TONIOLLI, R. Pouvoir fecondant des spermatozoïdes de verrat: amèlioration des conditions de conservation. 1996. 91p. Tese de Doctorat (Doutorado em Ciência da Vida) - Université François Rabelais de Tours, Tours, France.

VASCONCELOS, A.M.M.; MORAES, G.V.; RIGOLON, L.P. e MARTINS, E.N Caracteristicas espermaticas de semen resfriado de suíno e conservado em diferentes diluentes. Revista Brasileira de Zotecnia, 30(2): 394-401, 2001.

VERSTEGEN, J; IGUER-OUADA, M e ONCLIN, K. Computer assisted sêmen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, 57: 149 -179, 2002.

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**, 62: 1638-1651, 2004.

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

ANEXOS

Re: Artigo de revisão CASA
De: **rbra@cbra.org.br**
Enviada: quinta-feira, 5 de junho de 2008 18:42:46
Para: Darlete Lima Matos (dadamatos@hotmail.com)

Prezado Dr. DL Matos**,**

Recebemos e agradecemos o manuscrito "**Analise computarizada de sêmen: Revisão"** submetido à Revista Brasileira de Reprodução Animal. O trabalho recebeu o protocolo **RE176** e será enviado para a análise de pelo menos dois relatores *ad hoc* e faremos contato tão logo tenhamos uma posição sobre a situação corrente do mesmo.

Atenciosamente,

Secretaria da RBRA/

deProf. Dr. Ronaldo Lopes Oliveira <rbspa@ufba.br>
paraDarlete Lima Matos <dadamatos@gmail.com>

data21 de outubro de 2008 17:22
assunto[RBSPA] Agradecimento pela Submissão
enviado porbarragrande4.ufba.br

ocultar detalhes 17:22 (2 horas atrás) Responder

Darlete Lima Matos,

Agradecemos a submissão do seu manuscrito "Sobrevivência in vitro e fertilidade do sêmen suíno diluído a diferentes concentrações espermáticas e conservado a 17ºC" para Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal.

Para que o processo de tramitação se inicie é preciso que o autor principal envie, a partir do email registrado na RBSPA, o formulário de encaminhamento (http://www.rbspa.ufba.br//forms/form_encam_artigo.doc) para rbspa@ufba.br.

Após o envio do formulário de encaminhamento, por intermédio da interface de administração do sistema, utilizado para a submissão, será possível acompanhar o progresso do documento dentro do processo editorial, bastanto logar no sistema localizado em:

URL do Manuscrito:
http://revistas.ufba.br/index.php/rbspa/author/submission/1445
Login: dadamatos

Em caso de dúvidas, envie suas questões para este email. Agradecemos mais uma vez considerar nossa revista como meio de transmitir ao público seu trabalho.

Prof. Dr. Ronaldo Lopes Oliveira
Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal

Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal
http://revistas.ufba.br/index.php/rbspa

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo