

Taxa de penetração espermática *in vitro* em ovócitos suínos utilizando espermatozóides acondicionados com o diluente PIGPEL-5 à 5°C

(*In vitro* penetration rate of vitrified swine oocytes with swine spermatozoa conditioned with the PIGPEL-5 extender at 5°C)

M.N. Corrêa^{1,6}; T. Lucia Jr²; J. C. Deschamps³; C. G. Serret⁴; J. Bordignon⁵; G. Rambo⁵

¹Professor Adjunto, Departamento de Clínicas Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 96010-900, Pelotas/RS.,

²Professor Adjunto, Departamento de Patologia Animal, Faculdade de Veterinária

³Professor Titular, Departamento de Patologia Animal, Faculdade de Veterinária

⁴Médica Veterinária, Mestranda em Biotecnologia Agrícola-UFPel; ⁵Estudante em Medicina Veterinária.

⁶Correspondência: : vaqueano@ufpel.edu.br; thomaz@ufpel.edu.br.; deschamp@ufpel.edu.br

Resumo

O objetivo deste experimento foi avaliar o efeito de um diluente para acondicionamento de sêmen suíno à 5°C (PIGPEL-5), sobre a taxa de penetração espermática *in vitro*, comparado com o sêmen diluído com BTS e acondicionado à 17°C. Foram utilizados ejaculados de 4 machos suínos, coletados por duas vezes (Coleta 1 e 2). Os ejaculados foram coletados pelo método da mão enluvada. Após a coleta do sêmen, foram registradas as informações quanto ao volume, aspecto, motilidade, vigor e concentração, para cada ejaculado. Foram produzidas doses inseminantes heterospermicas, provenientes de 2 machos, de maneira que cada dose contivesse 4×10^9 espermatozóides. As doses com o diluente BTS foram acondicionadas à 17°C e com o diluente PIGPEL-5 à 5°C. Nas temperaturas específicas para cada diluente, as doses inseminantes ficaram acondicionadas por 48 horas, sendo avaliadas após a coleta e a cada 24 horas quanto ao número médio de espermatozóides que penetraram por ovócito e quanto à taxa de fertilização *in vitro*. Todas as análises foram realizadas através do programa STATISTIX[®]. Foram utilizados 1.168 ovócitos, com uma taxa de penetração geral de 77%. Para o teste de penetração *in vitro* (PEVI) realizado após a coleta do sêmen, foram penetrados 315 ovócitos, às 24 horas 302 ovócitos e às 48 horas 282 ovócitos. Para a coleta 1, a média de espermatozóides que penetraram por ovócito (EPO) após a coleta, com 24 e 48 horas de acondicionamento foi de $4,4 \pm 4,6$, $3,7 \pm 4,9$ e $3,4 \pm 3,5$, respectivamente. Já para a coleta 2, a média foi de $4,0 \pm 3,6$, $3,1 \pm 3,9$ e $2,6 \pm 3,9$, a cada 24 horas. Para o PEVI após 24 e 48 horas de acondicionamento, não foi observada diferença estatística ($P > 0,05$), porém, foi observada diferença ($P < 0,05$) após a coleta. As médias de EPO, a cada período (após a coleta, 24 e 48 horas de acondicionamento), não foram diferentes ($P > 0,05$) para o sêmen diluído com o PIGPEL-5 ou com o BTS. Para o diluente PIGPEL-5, a média de EPO após a coleta, 24 e 48 horas de acondicionamento foi de $4,3 \pm 4,2$, $3,7 \pm 5,0$ e $2,8 \pm 3,4$, respectivamente. Já para o

diluente BTS foi de $4,1 \pm 4,1$, $3,6 \pm 3,9$ e $2,8 \pm 4,0$, a cada 24 horas. As frequências para taxa de penetração *in vitro* para sêmen proveniente da coleta 1 e 2, logo após a coleta e às 24 e 48 horas de acondicionamento não foram diferentes ($P > 0,05$), sendo de, respectivamente, 55,6%, 48,3% e 46,5%, enquanto que para a coleta 2 foi de 53,5%, 51,7% e 44,4%, a cada 24 horas. Já as frequências para taxa de penetração *in vitro* para sêmen diluído com PIGPEL-5 e com BTS, após a coleta e as 24 e 48 horas de acondicionamento foram, respectivamente: (54,6%, 53,3% e 52,9%) e (63,8%, 55,3% e 45,4%), não sendo diferentes entre si ($P > 0,05$). A partir dos resultados deste experimento, pode-se concluir que o diluente PIGPEL-5 é capaz de produzir adequadas taxas de penetração *in vitro* após o acondicionamento, comparado com o diluente BTS.

Palavra-chave: sêmen suíno, diluente, penetração espermática, fertilização.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effect of diluent to swine semen conditioning at 5°C (PIGPEL-5) in the spermatozoa penetrating capacity rate, compared with the diluted semen with BTS at 17°C conditioning. Ejaculates from four boars that were collected twice (Collect 1 and 2) were utilized. The ejaculates were collected through hand-gloved method. After the semen collected records were taken about the volume, aspect, motility, vigor and concentration to each one of the ejaculates. Heterospermic doses, from two boars, both including 4×10^9 spermatozoas per dose were produced. The doses with BTS were conditioned at 17°C and with PIGPEL-5 at 5°C. In the temperatures to each one diluent, insemination doses were conditioned per 48 h and were evaluated after collecting and each 24 h, the average number of spermatozoas that penetrated per oocytes (SPO) and the spermatozoa penetrating capacity rate. All the statistical analysis were conducted using the STATISTIX[®] program. A total of 1.168 oocytes, with

Recebido: 20 de agosto de 2004

Recebido do autor após modificações: 22 de novembro de 2004

Approved for publication: 13 de dezembro de 2004

77% global penetration rate were used. To the spermatozoa penetrating capacity test conducted after the semen collected penetrated 315, at 24 h 302 and at 48 h 288 oocytes. In the collecting 1, the SPO media after the semen collected, with 24 and 48 h conditioning was the 4.4 ± 4.6 , 3.7 ± 4.9 e 3.4 ± 3.5 , respectively. But in the collect 2, the media was 4.0 ± 3.6 , 3.1 ± 3.9 e 2.6 ± 3.9 , each 24 h. To the spermatozoa penetrating capacity test, after 24 and 48 h conditioning, no differences was observed ($P > 0.05$), but was observed after the collection ($P < 0.05$). The SPO medias (after the collect, 24 e 48 h conditioning) was not different ($P > 0.05$) to the diluted semen with PIGPEL-5 or BTS. To the PIGPEL-5, the SPO media after the collect, 24 e 48 h conditioning was 4.3 ± 4.2 , 3.7 ± 5.0 e 2.8 ± 3.4 , respectively. To the BTS was 4.1 ± 4.1 , 3.6 ± 3.9 e 2.8 ± 4.0 , each 24 h. The frequencies for spermatozoa penetrating capacity rate to semen collect 1 and 2, after the collecting and 24 and 48 h conditioning were not different ($P > 0.05$), were 55.6%, 48.3% and 46.5%, to the collect 1 and 53.5%, 51.7% and 44.4%, to the collect 2, each 24 h. The frequencies for spermatozoa penetrating capacity rate to diluted semen with PIGPEL-5 and with BTS after the collect and 24 e 48 h conditioning were, respectively: (54.6%, 53.3% e 52.9%) e (63.8%, 55.3% e 45.4%), and no differences were observed between treatments ($P > 0.05$). These results indicate that the PIGPEL-5 diluent is capable to produce great spermatozoa penetrating capacity rates after conditioning, as compared to BTS diluent.

Keywords: swine, diluent, spermatozoa penetrating, fertilization.

Introdução

O uso da inseminação artificial (IA) em granjas de suínos tem aumentado marcadamente nos últimos anos, com conseqüente aumento no volume de produção das centrais que comercializam sêmen, em função de benefícios sanitários, genéticos e econômicos. Assim, com a evolução e crescente tecnificação da suinocultura, a IA se consolida como um importante instrumento capaz de auxiliar o produtor e a agroindústria, a colocarem no mercado produtos cada vez mais qualificados e saudáveis (Almond *et al.*, 1998; Althouse *et al.*, 1998; Deschamps *et al.*, 1998).

Para a inseminação artificial em suínos costuma-se utilizar sêmen acondicionado no estado líquido, devido aos maus resultados de fertilidade, com a utilização de sêmen congelado (Johnson, 1985). A temperatura utilizada para o acondicionamento é de 15-18°C, com os diluentes capazes de preservar a capacidade fertilizante dos espermatozoides, dos quais o mais utilizado é o *Beltsville Thawing Solution* (BTS) (Pursel & Johnson 1975; Johnson *et al.*, 2000).

O acondicionamento das doses inseminantes entre 15 e 18°C determina que sejam utilizadas caixas acondicionadoras, que costumam ter dificuldade em estabilizar nessa faixa de temperatura, além de terem um custo elevado principalmente para granjas de menor porte. Sendo assim, uma importante alternativa é a de utilizar refrigeradores domésticos com temperatura média de 5°C, o que permitiria uma maior disseminação da IA, pela possibilidade da utilização da técnica por todos os sistemas de produção, mesmo em unidades com menor disponibilidade de recursos financeiros. Com isso, unidades de produção de qualquer porte poderiam desfrutar dos benefícios da IA (Pursel *et al.*, 1973; Bortolozzo & Wentz, 1997; Deschamps *et al.*, 1998). Afora estas questões, basicamente relacionadas a maximizar a utilização da IA, é importante considerar que a proliferação de bactérias é reduzida em temperatura de 5°C, o que colabora para a qualificação da dose inseminante, além de, através da redução da atividade metabólica ocorrida nesta temperatura, permitir um acondicionamento mais prolongado (Mies Filho, 1982).

O uso de sêmen suíno resfriado à 5°C é, em geral, limitado por estar associado a menor fertilidade e prolificidade, se comparado ao sêmen resfriado a 15-18°C, principalmente, devido à reduzida motilidade e perda da integridade de membrana após o acondicionamento (Dziuk & Henshaw, 1958; First *et al.*, 1963; De Leeuw *et al.*, 1990). Por este motivo, o acondicionamento de sêmen suíno a esta temperatura não vem sendo utilizado, sendo necessário o desenvolvimento de diluentes capazes de acondicionar um sêmen mantido à 5°C, sem perda da qualidade no que diz respeito principalmente à sobrevivência espermática e quanto a características morfo-estruturais (Pursel *et al.*, 1973; Deschamps *et al.*, 2000).

Os métodos normalmente utilizados para avaliar a qualidade espermática, baseados na avaliação das características de qualidade do sêmen, como, motilidade, concentração e morfologia espermática (Almond *et al.*, 1998; Tardif *et al.* 1999; Gadea & Matás, 2000; Corrêa *et al.*, 2001), não estimam com precisão a real capacidade fecundante do espermatozoide, pois os seus resultados nem sempre são correlacionados com fertilidade (Barth, 1992).

A técnica de fertilização *in vitro* (FIV) seria o método mais adequado para avaliar a qualidade seminal e a fertilidade de um macho suíno (Abeydeera *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 1998), uma vez que avalia, sob condições controladas de laboratório, as etapas do processo de fertilização, fornecendo informações detalhadas sobre todos os estágios da penetração espermática (Bavister, 1990; Martinez *et al.*, 1993). No entanto, o uso da FIV exige o domínio dos complexos e onerosos mecanismos de maturação ovocitária e capacitação espermática, além do cultivo do presumível zigoto. Sendo assim, é necessário que a metodologia da FIV



seja simplificada, a fim de facilitar a sua execução e diminuir o efeito particular de cada ejaculado ou macho, como a relação espermatozóide-ovócito, para obter os melhores índices com relação à sua capacidade fecundante.

Uma vez que, para avaliar a capacidade fecundante de um ejaculado ou dose inseminante, não é preciso ocorrer à produção de embriões, é possível utilizar o teste de penetração espermática *in vitro* (PEVI) em ovócitos homólogos, pois este método exige uma metodologia menos complexa, mas que assim como a FIV consegue diferenciar machos ou doses inseminantes com diferentes potenciais fecundantes (Berger *et al.*, 1996; Larsson & Rodríguez-Martínez, 2000). Assim, o PEVI é menos complexo e exige menor tempo na sua execução, uma vez que elimina as etapas de maturação ovocitária e cultivo dos zigotos, que necessitam de meios de cultivo complexos. Outra vantagem do PEVI é que os ovócitos utilizados não necessitam ser oriundos de fêmeas suínas recém abatidas podendo-se usar ovários previamente congelados e descongelados (Lynham & Harrison, 1998) ou ovários que foram processados e armazenados em solução salina hipersaturada (Gadea *et al.*, 1998). Também é possível a utilização de ovócitos suínos imaturos criopreservados, evitando-se assim a necessidade de buscar ovários diariamente em abatedouros.

O objetivo deste experimento foi avaliar o efeito de um diluente para acondicionamento de sêmen suíno à 5°C (PIGPEL-5), sobre a taxa de penetração espermática *in vitro*, comparado com o sêmen diluído com BTS e acondicionado à 17°C.

Material e Métodos

Para realização deste estudo foram utilizados ejaculados de 4 machos suínos, provenientes do cruzamento entre as raças Landrace e Large White, sendo realizadas duas coletas com intervalo de 20 dias (Coleta 1 e 2). Todos os machos estavam alojados na Fazenda da Palma (Universidade Federal de Pelotas-RS), sendo manejados sob as mesmas condições ambientais, com arraçoamento realizado duas vezes ao dia, com 2 Kg de ração, contendo 3000 Kcal/kg de energia metabolizável e 14% de proteína bruta (NRC, 1998).

Os ejaculados foram coletados pelo método da mão enluvada, em um frasco pré-aquecido e coberto com uma tripla camada de gaze, a fim de separar a fração gelatinosa do sêmen (Hancock & Hovell, 1959). Após a coleta do sêmen, foram registradas as informações quanto a volume, aspecto, motilidade, vigor e concentração para cada ejaculado. A avaliação da motilidade se deu pela deposição de uma alíquota de sêmen (10 µl), em uma lâmina coberta por uma lâminula, ambas, previamente aquecidas a 37°C. A motilidade foi determinada por um técnico treinado, entre 0 e

100%, com intervalos de 5%, em microscópio de contraste de fases com aumento de 200 vezes. Nesta mesma observação, era avaliado o vigor numa escala de 1 a 5 (Almond *et al.*, 1998).

Após a coleta foram produzidas doses inseminantes heterospérmicas, ou seja, os ejaculados foram misturados formando um *pool*, de maneira que cada dose contivesse células espermáticas de 2 machos. Assim foram elaborados 2 *pools* que foram avaliados quanto a motilidade, vigor e concentração (Almond *et al.*, 1998; Corrêa *et al.*, 2001).

Para elaboração da dose inseminante, o número de células espermáticas foi determinado através do espermiodensímetro (Busch *et al.*, 1991), de maneira que em cada dose houvesse em torno de 4×10^9 espermatozoides. A avaliação no espermiodensímetro consistiu em observar o grau de turvação de uma suspensão de espermatozoides. O procedimento iniciava com a preparação, no densímetro, de uma suspensão de 9 mL de uma solução salina a 1%, na qual era adicionado 1 mL do sêmen a ser examinado. Esta amostra era homogeneizada completamente, com movimentos suaves. Para ejaculados muito densos, em que a escala não era legível era feita uma pré-diluição com BTS (ex: 1:1). Para determinar o valor correspondente a um determinado ejaculado, colocava-se uma tira de papel branco atrás da superfície com a escala de leitura do densímetro, fixando-o entre o dedo polegar e o indicador. A leitura era efetuada com luz natural, sendo realizada com o braço esticado e na altura dos olhos. Inicialmente, fazia-se a leitura da decimal inteira da escala (ex: 60, 70, 80), a qual era ainda visível como número. Em uma leitura correta o número seguinte (ordem crescente) era visto somente como uma sombra difusa e o número inferior lido com clareza. Posteriormente, fazia-se a verificação se o traço indicativo do meio decimal da escala (ex: 65, 75, 85), podia ser visualizado. Em caso positivo, o meio decimal passava a ser a leitura válida. Em caso negativo, considerava-se como valor do densímetro a leitura decimal inteira imediatamente inferior. Para a leitura do valor, usava-se uma tabela fornecida pela empresa que revende o espermiodensímetro, cujos valores expressam a densidade do ejaculado em milhões de espermatozoides por mililitro. Por exemplo, para uma leitura no densímetro de 70, encontrava-se na tabela o número 210, o que significava que o ejaculado examinado possuía uma densidade de 210 milhões de espermatozoides/mL. Caso tivesse sido realizada uma diluição 1:1 na preparação inicial da suspensão, levava-se em consideração ao calcular o número total de espermatozoides.

Os ejaculados foram diluídos, em condições isotérmicas, com dois diferentes diluentes, sendo: BTS (Pursel & Johnson, 1975) e PIGPEL-5. Foram desprezados ejaculados que apresentassem motilidade inferior a 60% antes da diluição (Almond *et al.*, 1998). Após

a diluição, as doses foram expostas à seguinte curva de resfriamento: 3 horas à 22-24°C, sendo após acondicionadas de acordo com a temperatura específica para cada diluente. As doses com o diluente BTS, foram acondicionadas em caixa térmica à temperatura de 17°C, seguindo a recomendação para este diluente (Johnson *et al.*, 2000). Já as doses de sêmen diluído com PIGPEL-5, foram acondicionadas em uma geladeira com termostato regulado para a temperatura de 5°C. Tanto a caixa acondicionadora (17°C), como a geladeira (5°C), tiveram a temperatura aferida para o período de acondicionamento, através de um termômetro digital de alta precisão¹.

Nas correspondentes temperaturas específicas para cada diluente, as doses inseminantes ficaram acondicionadas por 48 horas. Antes de serem processadas para a realização do PEVI, as doses inseminantes eram avaliadas quanto a motilidade, o vigor e a morfologia espermática (Pursel *et al.*, 1972); teste do estresse térmico (Fiser *et al.*, 1991); teste do choque hipoosmótico (Vazquez *et al.*, 1997). Os resultados obtidos se encontravam dentro dos padrões mínimos recomendados para a espécie suína (Almond *et al.*, 1998; Corrêa *et al.*, 2001). Como se tratavam de 2 *pools*, coletados e processados sob as mesmas condições e em duas datas de coleta, os resultados da avaliação da qualidade espermática não foram submetidos a análise estatística, para verificação dos efeitos e associações com os resultados obtidos pelo PEVI.

Para a avaliação da capacidade de penetração espermática *in vitro* do sêmen diluído com BTS e PIGPEL-5, foram inseminados ovócitos suínos após a coleta, 24 e 48 horas após o acondicionamento à 17°C e à 5°C, respectivamente. Foram utilizados 1.168 ovócitos previamente vitrificados e posteriormente utilizados para o PEVI.

Abaixo descreve-se a seqüência dos procedimentos para a realização do PEVI.

Coleta dos ovócitos

Para a realização do PEVI, foram utilizados ovócitos puncionados de folículos ovarianos de 3 a 6 mm de diâmetro (Xu *et al.*, 1996) de leitões pré-púberes, coletados em abatedouro. Os ovários foram transportados até o laboratório em solução salina a 0,9%, acrescida de 100 mg de sulfato de kanamicina, à temperatura 30°C. Após a punção, foi executada a procura e seleção dos ovócitos com o auxílio de lupa estereomicroscópica. Posteriormente, foram realizadas lavagens em PBS (*phosphate buffered saline*) acrescido de 0,4% de albumina sérica bovina (BSA) e os ovócitos sofreram a retirada das células do *cumulus oophorus*,

eliminando possíveis diferenças em função do número de camadas de células existentes em cada ovócito, sem afetar a penetrabilidade dos espermatozoides (Matás *et al.*, 1996), e facilitando a técnica de vitrificação.

Vitrificação e desvitrificação dos ovócitos

Nas soluções de vitrificação, foi adicionado 1% de um copolímero de álcool vinil, o qual tem capacidade de se ligar e inativar as impurezas que causam a formação de gelo em água ou soluções aquosas (Wolk *et al.*, 2000). Grupos de 10 ovócitos, previamente selecionados e desnudados, foram lavados em 5 gotas de PBS acrescido de 0,4% de BSA e equilibrados por 3 minutos em solução de vitrificação (VS1), constituída de 1,4M de DMSO (Dimetil sulfóxido), 1,8M de EG (Etilenoglicol) e 1% de copolímero de álcool vinil diluído em PBS acrescido de 0,4% de BSA. Após, os ovócitos foram lavados em 3 gotas contendo 100% da solução de vitrificação VS2 (2,8 DMSO + 3,6 M EG + 0,6 M de sacarose + 1% de copolímero de álcool vinil) por um minuto e envasados em palhetas pelo sistema OPS (*open pulled straw*) e então imersos em nitrogênio líquido (adaptado de Bertholot *et al.*, 2000).

No descongelamento, as palhetas foram expostas ao ar por 5 segundos e após a extremidade que continha os ovócitos foi imersa em solução de rehidratação constituída de 0,5M de sacarose em PBS, por 5 minutos e na seqüência eles passaram por soluções de 0,25M e 0,125M de sacarose e PBS com 0,4% de BSA, também por 5 minutos.

Preparação dos espermatozoides

Na preparação dos espermatozoides para a realização do PEVI foram utilizadas alíquotas de 12 mL de sêmen que foram centrifugadas por 3 minutos a 60 G. Após, o sobrenadante foi transferido para outro frasco e novamente centrifugado por 3 minutos a 1200 G. Depois o *pellet* foi resuspenso em 10 mL de solução de PBS acrescido de 0,4% de BSA, 0,11g de cloreto de cálcio, 0,005g de Estreptomicina, 0,0075g de Penicilina e centrifugado por 3 minutos a 1200 G, este procedimento foi repetido por mais 2 vezes. Os espermatozoides lavados foram diluídos a uma concentração de 2 x 10⁸ espermatozoides/mL em meio de pré-incubação constituído de TCM 199, com pH 7,8, suplementado com 12% de SFB e pré-incubados por 40 minutos à 38,5°C, em tubos cônicos de 15 mL (Martínez *et al.*, 1993).

Inseminação dos ovócitos

Para cálculo da concentração das doses inseminantes após a coleta, 24 e 48 horas após o acondicionamento, avaliava-se a motilidade e o vigor das amostras, considerando-se o número de células vivas

¹ Temp Record for Windows, Version 3.14. 1997. Temp Record Software by Applied Digital Research Ltda.



para compor a dose inseminante.

Os espermatozoides pré-incubados foram adicionados à gota de fecundação (300 µl), sob óleo mineral em placas de cultivo celular de 35 mm, em uma concentração de 1×10^6 espermatozoides/mL (adaptado de Grupen *et al.*, 1997), onde já estavam os ovócitos previamente vitrificados/desvitrificados.

Grupos de 35 ovócitos foram incubados com os espermatozoides por 18 horas em estufa de CO₂, em meio de fertilização constituído de TCM 199, com pH 7,4, com os mesmos aditivos do meio ao qual os espermatozoides foram pré-incubados, porém, acrescido de 2 mM de cafeína (adaptado de Martínez *et al.*, 1993).

Avaliação da capacidade de penetração espermática

Ao término do período de inseminação, os ovócitos foram pipetados repetidamente para a retirada dos espermatozoides que estivessem aderidos à zona pelúcida. A contagem do número de espermatozoides penetrados foi realizada com o corante Hoescht 33342 (Ivanova & Mollova, 1993), em microscópio ótico de fluorescência com aumento de 400 vezes. Os ovócitos foram considerados penetrados quando a cabeça do espermatozoide foi observada no interior do citoplasma ovocitário (Mátas *et al.*, 1996).

Análise estatística

Estatísticas descritivas foram calculadas para o percentual de ovócitos utilizados para o sêmen diluído com o PIGPEL-5 e com o BTS, para os dois *pools* e também para o número e o percentual de ovócitos penetrados em cada período (após a coleta e 24 e 48 horas de acondicionamento).

O número médio de espermatozoides que penetraram por ovócito foi considerado como variável dependente, sendo conduzidas análises de variância (ANOVA de Kruskal-Wallis para dados não paramétricos)

para estimar os efeitos dos diluentes e das datas de coletas (Coleta 1 e 2) sobre esta variável. Foram geradas médias do número de espermatozoides que penetraram por ovócito e um *ranking* médio que foi submetido à comparação para cada diluente e data de coleta.

Como variáveis independentes para as variáveis anteriormente descritas, considerou-se o diluente, o *pool* e o período de acondicionamento.

Variações na taxa de penetração *in vitro* entre as duas datas de coleta e os dois diluentes, na coleta, 24 e 48 após o acondicionamento, foram analisadas através do teste do qui-quadrado (χ^2), sendo geradas distribuições de frequências.

Todas as análises foram realizadas através do programa STATISTIX® (Statistix, 2000).

Resultados e Discussão

Do total de ovócitos utilizados neste experimento (1.168), 51,9% (607) foram inseminados com sêmen da primeira coleta e 48,0% (561) com sêmen da segunda coleta.

O percentual de ovócitos utilizados para cada tratamento e *pool* é citado na Tab. 1, demonstrando uma distribuição homogênea para cada variável. Este fato fortalece possíveis inferências a partir dos resultados do experimento à medida que, em especial, o efeito dos diluentes tenha sido testado em condições similares quanto ao número de ovócitos. No PEVI após a coleta, dos ovócitos utilizados 40,8% foram inseminados com sêmen acondicionado com o PIGPEL-5 e 59,2% com BTS. Após 24 e 48 horas de acondicionamento o número de ovócitos utilizados foi, para o diluente PIGPEL-5 e BTS, respectivamente, 45,6% e 54,4%, 53,7% e 46,3%. Em relação à distribuição de ovócitos para cada *pool* utilizado teve-se após a coleta, 40,5% e 59,5%, após 24 horas, 40,9% e 59,1%, após 48 horas, 43,5% e 56,5%, para o *pool* 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1. Percentual de ovócitos utilizados para o sêmen diluído com o PIGPEL-5 e com o BTS e também para os dois *pools*, em cada período (0, 24 e 48 horas)

Período	Tratamento		Pool	
	PIGPEL-5	BTS	1	2
Após a coleta	40,8	59,2	40,5	59,5
24 horas	45,6	54,4	40,9	59,1
48 horas	53,7	46,3	43,5	56,5

Do total de ovócitos utilizados, 77% (899) foram penetrados por pelo menos 1 espermatozoide. Na Tab. 2 são descritos o número e o percentual de ovócitos penetrados em cada período. Para o PEVI realizado

após a coleta do sêmen, foram penetrados 315 ovócitos, às 24 horas 302 ovócitos e às 48 horas 282 ovócitos, correspondendo, respectivamente, a 89%, 73,4% e 71,2%.

Tabela 2. Número e percentual de ovócitos penetrados em cada período (após a coleta, 24 e 48 horas de acondicionamento)

Período	Ovócitos penetrados	
	N	Percentual
Após a coleta	315	89,0
24 horas	302	73,4
48 horas	282	71,2
Total	899	77,0

Da mesma maneira, que é reduzido o número de publicações científicas com sêmen resfriado a 5°C, não se dispõe de informações a respeito do uso do teste de penetração espermática *in vitro* para avaliar a capacidade fecundante de espermatozoides acondicionados à 5°C. Porém, como alguns dos problemas, tais como redução da motilidade e lesões do acrossoma, associados ao congelamento do sêmen suíno podem ser também observados após o resfriamento à 5°C (Dziuk & Henshaw, 1958; First *et al.*, 1963; De Leeuw *et al.*, 1990), pode-se traçar um paralelo de comparação, utilizando resultados de experimentos que utilizaram o PEVI para testar a capacidade fecundante de esperma-

tozoides submetidos ao congelamento. Córdova *et al.*, (1997) após realizar fertilização *in vitro* para diagnosticar a capacidade fecundante de sêmen congelado suíno, obteve uma taxa de fertilização após a coleta de 85%, que foi similar a taxa de penetração de 89% observada neste experimento, também após a coleta. Em outros estudos, foram encontradas taxas de penetração que variaram de 84,2% a 93,5%. (Martinez *et al.*, 1993) e de 73,0% a 97,9% (Xu *et al.*, 1998).

Na Fig. 1 observa-se a distribuição do número mínimo e máximo de EPO para cada período (após a coleta, 24 e 48 horas de acondicionamento), o que concorda com o elevado desvio padrão das médias de EPO.

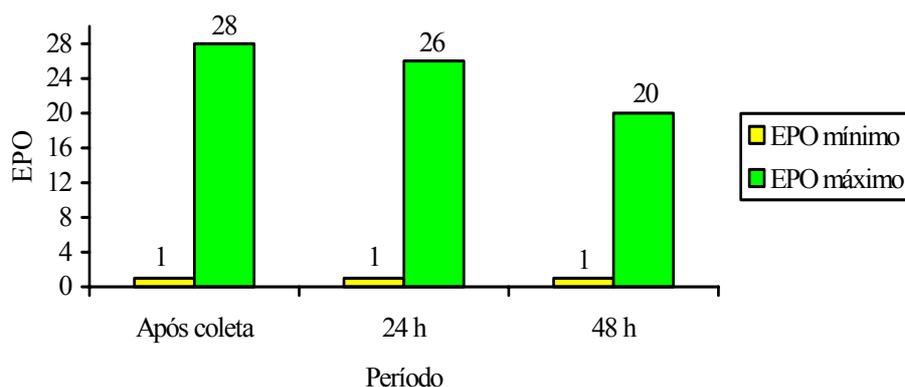


Figura 1. Número mínimo e máximo de espermatozoides que penetraram por ovócito (EPO) para cada período de acondicionamento (após a coleta, 24 e 48 horas).

Na Tab. 3 são descritas as médias do número de espermatozoides que penetraram por ovócito (EPO) para cada uma das duas coletas de sêmen, bem como o *ranking* médio. Para coleta 1, a média de EPO após a coleta, 24 e 48 horas de acondicionamento foi de $4,4 \pm 4,6$, $3,7 \pm 4,9$ e $3,4 \pm 3,5$, respectivamente. Já para a coleta 2, a média foi de $4,0 \pm 3,6$, $3,1 \pm 3,9$ e $2,6 \pm 3,9$, a cada 24 horas. Para o PEVI após 24 e 48 horas de

acondicionamento não foi observada diferença ($P > 0,05$) do *ranking* sendo, porém, observada diferença ($P < 0,05$) após a coleta. É possível que esta diferença seja consequência de algum efeito associado ao processamento do sêmen nesta coleta em específico, ainda que o sêmen utilizado estivesse de acordo com as recomendações mínimas de qualidade para a diluição e posterior acondicionamento (Almond *et al.*, 1998).

 Tabela 3. *Ranking* médio e médias de espermatozoides que penetraram por ovócito (EPO) em cada período (após a coleta, 24 e 48 horas de acondicionamento) em cada coleta de sêmen.

Período	Coleta 1		Coleta 2	
	<i>Ranking</i>	EPO \pm DP*	<i>Ranking</i>	EPO \pm DP*
Após a coleta	207,2 a	$4,4 \pm 4,6$	177,8 b	$4,0 \pm 3,6$
24 horas	183,8 c	$3,7 \pm 4,9$	176,9 c	$3,1 \pm 3,9$
48 horas	178,1 d	$3,4 \pm 3,5$	165,0 d	$2,6 \pm 3,9$

Valores para o *ranking* com expoentes diferentes na mesma linha diferiram por pelo menos $P < 0,05$

* DP = Desvio Padrão



As médias de EPO e o *ranking* médio, a cada período (após a coleta, 24 e 48 horas de acondicionamento), por tratamento são descritas na Tab. 4, não sendo observadas diferenças ($P > 0,05$) para o sêmen diluído com o PIGPEL-5 ou com o BTS. Para o diluente PIGPEL-5 a média de EPO após a coleta, 24 e 48 horas de acondicionamento foi de $4,3 \pm 4,2$, $3,7 \pm 5,0$ e $2,8 \pm 3,4$, respectivamente. Já para o diluente BTS foi de $4,1 \pm 4,1$, $3,6 \pm 3,9$ e $2,8 \pm 4,0$, a cada 24 horas. Em outro estudo, Martinez *et al.*, (1993) observaram, utilizando sêmen após a coleta, uma média de EPO de 7,4, sendo, portanto, superior às encontradas neste experimento. Porém, o fato deste trabalho ter utilizado um número inferior de ovócitos ($n = 170$) em relação ao presente experimento

(1.168), pode ter provocado alguma influência nos resultados obtidos. Já Xu *et al.*, (1998) obtiveram um número de EPO que variou de 3,3 a 18,7, o que se aproxima dos achados deste estudo que obteve médias de EPO após a coleta de 4,3 (PIGPEL-5) e 4,1 (BTS) com um elevado desvio padrão para cada média (Tab. 4). No estudo de Xu *et al.*, (1998) esta variação foi atribuída a capacidade fertilizante dos diferentes machos utilizados. Já no presente experimento, não foram observados efeitos ($P > 0,05$) do *pool* utilizado sobre o número de EPO em nenhum dos três períodos, bem como para a taxa de penetração *in vitro*, não se podendo relacionar, portanto, os resultados com a capacidade fecundante dos diferentes *pools* utilizados.

Tabela 4. *Ranking* médio e médias de espermatozoides que penetraram por ovócito (EPO) em cada período (após a coleta, 24 e 48 horas de acondicionamento) para o tratamento PIGPEL-5 e BTS.

Período	PIGPEL-5		BTS	
	<i>Ranking</i>	EPO \pm DP*	<i>Ranking</i>	EPO \pm DP*
Após a coleta	203,3	$4,3 \pm 4,2$	185,3	$4,1 \pm 4,1$
24 horas	179,8	$3,7 \pm 5,0$	184,5	$3,6 \pm 3,9$
48 horas	157,6	$2,8 \pm 3,4$	174,8	$2,8 \pm 4,0$

Valores para o *ranking* na mesma linha não diferiram por pelo menos $P > 0,05$

* DP = Desvio Padrão

As freqüências para taxa de penetração *in vitro* para sêmen proveniente da coleta 1 e 2, logo após a coleta e às 24 e 48 horas de acondicionamento são demonstradas na Tab. 5. Diferenças não foram observadas ($P > 0,05$) entre a taxa de penetração para qualquer

dos três períodos tanto na coleta 1, como na coleta 2. A taxa de penetração para a coleta 1 após a coleta, com 24 e 48 horas de acondicionamento foi de, respectivamente, 55,6%, 48,3% e 46,5%, enquanto que para a coleta 2 foi de 53,5%, 51,7% e 44,4%, a cada 24 horas.

Tabela 5. Freqüências para taxa de penetração *in vitro* para a coleta de sêmen 1 e 2, logo após a coleta e as 24 e 48 horas de acondicionamento

Coleta	Período		
	Após a coleta (%)	24 horas (%)	48 horas (%)
Coleta 1	55,6	48,3	46,5
Coleta 2	53,5	51,7	44,4

*Freqüências na mesma coluna não diferiram de acordo com o teste χ^2 ($P > 0,05$)

Já para as freqüências para taxa de penetração *in vitro* para sêmen diluído com PIGPEL-5 e com BTS, após a coleta e as 24 e 48 horas de acondicionamento são demonstradas na Tab. 6. A taxa de penetração para o sêmen acondicionado com PIGPEL-5 (54,6%) logo após a coleta foi numericamente inferior a do BTS (63,8%), sendo que às 24 horas de acondicionamento esta diferença reduziu (53,3% para PIGPEL-5 e 55,3% para BTS), tendo-se, às 48 horas de acondicionamento, uma maior taxa de

penetração para o PIGPEL-5 (52,9%) do que para BTS (45,4%). Não foram observadas diferenças ($P > 0,05$), entre os tratamentos em qualquer dos períodos.

Neste estudo, observou-se uma taxa de penetração utilizando-se o diluente PIGPEL-5, independente do *pool* ou período de acondicionamento, de 55,9%, que mesmo sendo inferior aos 68% observados em outro estudo utilizando sêmen suíno congelado (Córdova *et al.*, 1997) é compatível com a taxa de penetração geral observada neste estudo quando usado o diluente BTS (54,1%).

Tabela 6. Frequências para taxa de penetração *in vitro* para cada tratamento (PIGPEL-5 e BTS) após a coleta do sêmen e as 24 e 48 horas de acondicionamento após diluição

Tratamento	Período		
	Após a coleta (%)	24 horas (%)	48 horas (%)
PIGPEL-5	54,6	53,3	52,9
BTS	63,8	55,3	45,4

*Frequências na mesma coluna não diferiram de acordo com o teste χ^2 ($P > 0,05$)

Conclusão

Os resultados deste experimento demonstram que o diluente PIGPEL-5 produz adequadas taxas de penetração *in vitro* após o acondicionamento de sêmen suíno a temperatura de 5°C.

Referências bibliográficas

- Abeydeera, L.R.; Johnson, L.A.; Welch, G.R. *et al.* Birth of piglets preselected for gender following in vitro fertilization of in vitro matured pig oocytes by X and Y chromosome bearing spermatozoa sorted by high speed flow cytometry. *Theriogenology*, v.50, p.981-988, 1998.
- Almond, G.W. ; Britt, J. ; Flowers, B. *et al.* *The swine AI book*. 2.ed. Raleigh, NC: Ed. Ruth Cronje; North Carolina State University, 1998.
- Althouse, G.C.; Wilson, M.E.; Kuster, C. *et al.* Characterization of lower temperatures storage limitations of fresh-extended porcine semen. *Theriogenology*, v.50, p.535-543, 1998.
- Barth, A.D. The relationship between sperm abnormalities and fertility. In: Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction of the National Associations of Breeders, 14, 1992, Milwaukee, WI. *Proceedings*. Milwaukee, WI: NAB, 1992. p.47-63.
- Bavister, B.D. Test of sperm fertilizing ability. In: Asch, R.H.; Balmaceda, J.P.; Johnston, L. *Gamete physiology*. [s.l.]: Sero Symposia, 1990. p.77-105.
- Berger, T.; Anderson, D.L.; Penedo, M.C.T. Porcine sperm fertilizing potencial in relationship to sperm functional capacities. *Animal Reproduction Science*, v.44, p.231-239, 1996.
- Bertholot, F.; Martinat-Botté, F.; Locatelli, A. *et al.* Piglets born0 after vitrification of embryos using the open pulled straw method. *Cryobiology*, v.41, p.116-124, 2000.
- Bortolozzo, F.P.; Wentz, I. Inseminação artificial em suínos no Brasil. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.21, p.13-15, 1997.
- Busch, W.; Löhle, K.; Peter, W. Prinzipien der Spermauntersuchung. In: Künstliche Besamung bei Nutztieren. Jena, Germany: G. Fischer Verlag, 1991. p. 275.
- Córdova, A.; Ducolomb, Y.; Jiménez, I. *et al.* In vitro fertilizing capacity of frozen-thawed boar sêmen. *Theriogenology*, v.47, p.1309-1317. 1997.
- Corrêa, M.N.; Meincke, W.; Lucia, T. *et al.* Inseminação artificial em suínos. Pelotas, RS: Ed: Marcio Nunes Corrêa, 2001. p. 181.
- De Leeuw, F.E., Colenbrander, B., Verkleij, A.J. The role membrane damage plays in cold shock and freezing injury. *Reprod. Domest. Anim. Suppl.*, n.1, p.95-104, 1990.
- Deschamps, J.C.; Corrêa, M.N.; Lucia, T. Jr. Impacto da inseminação artificial em suínos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* v.22, p.75-79, 1998.
- Deschamps, J.C.; Lucia, T.; Corrêa, M.N. *et al.* Otimização da eficiência do processo de produção animal a partir do uso de biotécnicas reprodutivas. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* ,v.24; p.21-29, 2000.
- Dziuk, P.J.; Henshaw, G. Fertility of boar semen artificially inseminated following *in vitro* storage. *J. Anim. Sci.* v.17, p.554, 1958.
- First, N.L.; Stratman, F.W.; Casida, L.E. Effect of sperm age on embryo survival in swine. *J. Anim. Sci.*, v.22, p.135, 1963.
- Fiser, P.S.; Hansen, C.; Underhill, L. *et al.* New thermal stress test to assess the viability of cryopreserved boar semen. *Cryobiology*. v.28, p.454-459, 1991.
- Gadea, J.; Matás, C.; Lucas, X. Prediction of porcine semen fertility by homologous in vitro penetration (hIVP) assay. *Anim. Reprod. Sci.*, v.56, p.95-108, 1998.
- Gadea, J.; Matás, C. Sperm factors related to in vitro penetration of porcine oocytes. *Theriogenology*, v.54, p.1343-1357. 2000.
- Gruppen, C.G.; Nagashima, H.; Nottle, M.B. Role of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-1 on porcine oocyte maturation and embryonic development in vitro. *Reprod. Fertil. Dev.*, v.9, p.571-575, 1997.
- Hancock, J.L.; Hovell, G.J.R. The collection of boar semen. *Vet. Rec.*, v.71, p.664-665, 1959.
- Ivanova, M.; Mollova, M. Zona-penetration in vitro teste for evaluating boar sperm fertility. *Theriogenology*, v. 40, p.397-410, 1993.
- Johnson, L.A. Fertility results using frozen boar spermatozoa 1970 to 1985. In: Johnson, L.A., Larsson, K. Eds. , Deep Freezing Boar Semen. *Proc. 1st Int. Conf. Deep Freezing of Boar Semen*. Swedish Univ. Agric. Sciences, Uppsala, p. 199-222. 1985.
- Johnson, L.A.; Weitze, K.F.; Fiser, P. *et al.* Storage of boar semen. *Anim. Reprod. Sci.* v.62, p.143-172. 2000.
- Larsson, B.; Rodriguez-Martínez, H. Can we use in vitro fertilization test to predict semen fertility? *Animal Reproduction Science*. v. 60-61, p. 327-336. 2000.



- Lynham, J.A.; Harrison, R.A.P.** Use of stored pig eggs to assess boar sperm fertilizing functions *in vitro*. *Biol. Reprod.*, v.58, p.539-550. 1998.
- Martínez, E.; Vásquez, J.M.; Matas, C. et al.** Evaluation of spermatozoa penetrating capacity using pig oocytes at the germinal vesicle stage. *Theriogenology*, v.40, p.547-557. 1993.
- Matás, C.; Martínez, E.; Vásquez, J.M. et al.** *In vitro* penetration of boar spermatozoa penetrating capacity using pig oocytes at the germinal vesicle stage. *Theriogenology*, v.46, p.503-513. 1996.
- Mies Filho, A.** *Reprodução dos animais e inseminação artificial*. 5. ed. Porto Alegre: Sulina, 1982. p. 499-602.
- National Research Council - NRC.** *Nutrient requirements of swine*. 10th rev. ed. Washington, DC:S, 1998. p.113-114, 123.
- Pursel, V.G.; Johnson, L.A.; Rampacek, G.B.** Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. *J. Anim. Sci.*, v.34, p.278-283. 1972.
- Pursel, V.G.; Schulman, L.L.; Johnson, L.A.** Effect of holding time on storage of boar spermatozoa at 5°C. *J. Anim. Sci.*, v.37, p.785-789. 1973.
- Pursel, V.G., Johnson, L.A.** Freezing of boar spermatozoa: Fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J. Anim. Sci.*, v.40, p.99-102. 1975.
- Statistix 7.** *User's manual analytical software*. Tallahassee, FL: [s.n.], 2000. p. 359.
- Tardif, S.; Laforest, J.P.; Cormier, N. et al.** The importance of porcine sperm parameters on fertility *in vivo*. *Theriogenology*, v. 52, p. 447-459. 1999.
- Vázquez, J.M.; Martínez, E.A.; Martínez, P. et al.** Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analysing the sperm membrane. *Theriogenology*, v. 47, p. 913-922. 1997.
- Wowk, B.; Leiti, E.; Rasch, C.M. et al.** Vitricificação enhancement by synthetic ice blocking agents. *Cryobiology*, v.40, p.228-236. 2000.
- Xu, X.; Seth, P.C.; Harbison, D.S. et al.** Semen dilution for assessment of boar ejaculate quality in pig IVM and IVF systems. *Theriogenology*, v.46, p.1325-1337. 1996.
- Xu, X.; Pommier, S., Arbov, T. et al.** *In vitro* maturation and fertilization techniques for assessment of semen quality and boar fertility. *J. Anim. Sci.*, v.76, p.3079-3089. 1998.
-