

EFEITO DO SÊMEN ACONDICIONADO A 5°C COM O DILUENTE PIGPEL-5 SOBRE A TAXA DE PENETRAÇÃO ESPERMÁTICA IN VITRO DE OVÓCITOS VITRIFICADOS

Corrêa, M.N.¹; Bianchi, I.¹; *Lucia Jr., T.¹; Serret, C.G.¹; Bordignon, J.¹; Rambo, G.¹; Deschamps, J.C.¹

¹ PIGPEL: Ensino, Pesquisa e Serviços em Produção de Suínos, Centro de Biotecnologia, Campus Universitário s/n°, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS, Caixa Postal 354, CEP 96010-900 ibianchi@ufpel.edu.br (53) 84051356

INTRODUÇÃO

O uso de sêmen suíno resfriado à 5°C é, em geral, limitado por estar associado a menor fertilidade e prolificidade, (5). Os métodos normalmente utilizados para avaliar a qualidade espermática baseados na avaliação das características, tais como, motilidade, concentração e morfologia espermática (4), não estimam com precisão a real capacidade fecundante do espermatozóide (1). A técnica de fertilização *in vitro* (FIV) seria um método que possui maior precisão na avaliação da qualidade seminal e fertilidade de um macho suíno (12), uma vez que avalia, sob condições controladas de laboratório, as etapas do processo de fertilização (7). No entanto necessita o domínio dos mecanismos de maturação ovocitária e capacitação espermática. Sendo assim, utiliza-se 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 (2). 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 d (Coleta 1 e 2). Todos os machos estavam alojados na Fazenda da Palma (Universidade Federal de Pelotas-RS). A coleta foi feita utilizando-se o método da mão enluvada. Após a coleta foi formado 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. Foram elaboradas doses com uma concentração final de 4×10^9 espermatozoides vivos por dose. Os ejaculados foram diluídos, com dois diferentes diluentes, sendo: BTS (9) e PIGPEL-5. As doses com o diluente BTS, foram acondicionadas em caixa térmica à temperatura de 17°C e as doses de sêmen diluído com PIGPEL-5, foram acondicionadas em uma geladeira com termostato regulado para a temperatura de 5°C. As doses inseminantes ficaram acondicionadas por 48 h. Antes de serem processadas para a realização do PEVI, eram avaliadas quanto a motilidade, o vigor e a morfologia espermática (8), teste do estresse térmico (6) e teste do choque hiposmótico (11). 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 h após o acondicionamento à 17°C e à 5°C. Foram utilizados 1.168 ovócitos previamente vitrificados e posteriormente utilizados para o PEVI. Todas as análises foram realizadas através do programa STATISTIX® (10).

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 Tabela 1, demonstrando uma distribuição homogênea para cada variável. No PEVI após a coleta, dos ovócitos utilizados, 40,8% foram inseminados com sêmen acondicionado com o PIGPEL-5 e 59,2% com BTS. Do total de ovócitos, 77% (899) foram penetrados por pelo menos 1 espermatozóide. Na Tabela 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 h 302 ovócitos e às 48 h 282 ovócitos, correspondendo, respectivamente a 89%, 73,4% e 71,2%. Em outro trabalho, 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 (3). Em outros estudos foram encontradas taxas de penetração que variaram de 84,2% a 93,5%. (7) e de 73,0% a 97,9% (12). Na Tabela 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 h 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 h. Para o PEVI após 24 e 48 h de acondicionamento não foi observada diferença ($P > 0,05$) do *ranking*, sendo, porém, observada diferença ($P < 0,05$) após a coleta. As médias de EPO e o *ranking* médio a cada período (após a coleta, 24 e 48 h de acondicionamento), por tratamento são descritas na Tabela 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 h 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 h. 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 h de acondicionamento são demonstradas na Tabela 5. 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 h de acondicionamento esta diferença reduziu (53,3% para PIGPEL-5 e 55,3% para BTS), tendo-se, às 48 h 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 (3) é compatível com a taxa de penetração geral observada neste estudo quando usado o diluente BTS (54,1%).

CONCLUSÕES

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

- BARTH, A.D. The relationship between sperm abnormalities and fertility. In: 14 th Tech. Conf. Artif. Insem. Reprod. Nat. Assoc. Breeders, Milwaukee, WI. **Proceedings**. p. 47-63. 1992.
- 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.
- CÓRDOVA, A.; DUCOLOMB, Y.; JIMÉNEZ, I.; CASAS, E.; BONILLA, E.; BETANCOURT, M. In vitro fertilizing capacity of frozen-thawed boar sêmen. **Theriogenology**. v. 47, p. 1309-1317. 1997.
- CORRÊA, M.N.; MEINCKE, W.; LUCIA, T.; DESCHAMPS, J.C. Inseminação Artificial em Suínos. 1a Edição. Ed: Marcio Nunes Corrêa, Pelotas – RS, p. 181. 2001.
- DE LEEUW, F.E., COLENBRANDER, B., VERKLEIJ, A.J. The role membrane damage plays in cold shock and freezing injury. **Reprod. Domest. Anim. Suppl.** 1, 95–104. 1990.
- FISER, P.S.; HANSEN, C.; UNDERHILL, L.; MARCUS, G.J. New thermal stress test to assess the viability of cryopreserved boar semen. **Cryobiology**. v. 28, p. 454-459. 1991.
- 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.
- PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A.; RAMPACEK, G.B. Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. **Journal of Animal Science**. v. 34, p. 278-283. 1972.
- PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A. Freezing of boar spermatozoa: Fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. **Journal of Animal Science**. v.40, p.99–102, 1975.
- STATISTIX®. Ed. **Analytical Software**. 2004.
- VAZQUEZ, J.M.; MARTINEZ, E.A.; MARTINEZ, P.; GARCIA-ARTIGA, C.; ROCA, J. Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analysing the sperm membrane. **Theriogenology**. v. 47, p. 913-922. 1997.
- XU, X.; POMMIER, S., ARBOV, T. et al. In vitro maturation and fertilization techniques for assessment of semen quality and boar fertility. **Journal of Animal Science**. v. 76, p. 3079-3089. 1998.

Tabela 1: Ovócitos (%) para o sêmen diluído com o PIGPEL-5 e BTS e para os dois *pools* em cada período (0, 24 e 48 h)

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

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

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

Tabela 3: Ranking médio e médias de EPO em cada período (após a coleta, 24 e 48 h de acondicionamento) em cada coleta de sêmen

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

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

Tabela 4: Ranking médio e médias de EPO (pós coleta, 24 e 48 h de acondicionamento) para o tratamento PIGPEL-5 e BTS

Período	PIGPEL-5		BTS	
	Ranking	EPO ± DP*	Ranking	EPO ± DP*
Após a coleta	203,3	4,3 ± 4,2	185,3	4,1 ± 4,1
24 horas	179,8	3,7 ± 5,0	184,5	3,6 ± 3,9
48 horas	157,6	2,8 ± 3,4	174,8	2,8 ± 4,0

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

Tabela 5: Frequências para taxa de PEVI por tratamento após a coleta do sêmen e as 24 e 48 h de acondicionamento

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 ($P > 0,05$)