

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola



Tese

**Teste de penetração espermática em oócitos *in vitro* e fertilidade *in vivo* após
inseminação heterospérmica em suínos**

Milton Carvalho Macedo Junior

Pelotas 2007

Milton Carvalho Macedo Junior

**Teste de penetração espermática em oócitos *in vitro* e fertilidade *in vivo*
após inseminação heterospermica em suínos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (Área do conhecimento: Reprodução Animal).

Orientador: João Carlos Deschamps

Pelotas, 2007

Dados de catalogação na fonte:

Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901

Biblioteca de Ciência & Tecnologia – UFPel

M141t Macedo Junior, Milton Carvalho

Teste de penetração espermática em oócitos *in vitro* e fertilidade *in vivo* após inseminação heterospermica em suínos / Milton Carvalho Macedo Junior ; orientador João Carlos Deschamps. – Pelotas, 2007. – 98f. – Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola. Centro de Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2007.

1.Biotecnologia. 2.Teste de penetração espermática *in vitro*. 3.Criopreservação de oócitos. 4.Diagnóstico de paternidade. 5.Suínos. I.Deschamps, João Carlos. II.Título.

CDD: 636.41

Banca Examinadora

Prof. João Carlos Deschamps

Prof. Marcelo Soares

Prof. Nelson José Laurino Dionello

Prof. Thomaz Lucia Jr.

*Dedico este trabalho ao meu orientador João
Carlos Deschamps, pela amizade, oportunidades,
confiança e o bom relacionamento durante todos
estes anos....*

Agradecimentos

À Deus, pela proteção.

À minha esposa Silviane Macedo por apoiar minhas decisões e por ajudar a conquistar meus ideais. Muito Obrigado!

Aos meus pais Milton e Nórís Macedo por me incentivarem a fazer o doutorado e me dar todo o suporte que estava ao alcance deles.

À minha irmã Fabiana pela incondicional amizade e apoio financeiro.

À minha irmã Lili, pela amizade e respeito.

Aos meus amigos Eduardo Ferreira Filho, Gissele Rambo, Alexandre Rosa, Cleonice Fabiane, Mônica Cabral, Ângelo Menin, Tiago Collares pela amizade, companheirismo, incansável vontade de ajudar e, por acreditarem no experimento.

À todos os integrantes do Laboratório de Biologia Molecular e Laboratório de Engenharia Genética Animal pelas orientações.

Aos professores Odir Dellagostin e Hédén Moreira e José Antônio Guimarães Aleixo, por permitirem usar os seus laboratórios.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa de estudo.

À unidade produtora de suínos, Granja Retiro, por permitir execução de parte do experimento em suas instalações.

Ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Agrícola, pela oportunidade e ensinamentos.

À todos os colegas e professores do centro de biotecnologia, pelo companheirismo e amizade.

Resumo

MACEDO JR, Milton Carvalho. **Teste de penetração espermática em oócitos *in vitro* e fertilidade *in vivo* após inseminação heterospérmica em suínos** 2007. 98f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Agrícola. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS.

O conhecimento do potencial reprodutivo de um macho é de importância econômica e reprodutiva, principalmente se ele é utilizado em programa de inseminação artificial. Os testes convencionais que avaliam a qualidade seminal não possuem a capacidade de medir o potencial fertilizante de uma amostra e, apenas indicam se a mesma é fértil ou não. O teste de penetração espermática *in vitro*, aparece neste contexto como um teste laboratorial alternativo para categorizar os machos férteis, quanto a sua capacidade de fecundação, pois mimetizam *in vitro* o que acontece *in vivo*. No entanto, este teste tem seu uso limitado por ser de difícil execução e por utilizar equipamentos de alto custo. Com o objetivo de simplificar o teste, o presente trabalho avaliou alternativas para diminuição do tempo de execução, utilização de oócitos criopreservados de diferentes maneiras e sua associação com fertilidade *in vivo* através de inseminação heterospérmica e diagnóstico de paternidade dos leitões nascidos. Foi concluído que: 1) É possível utilizar o sistema de incubação *FRASCO*, em substituição ao sistema de incubação convencional, eliminando a necessidade de uso da onerosa incubadora de CO₂; 2) Pode-se congelar oócitos em *CRIOTUBO*, juntamente com o meio de fecundação e óleo mineral, eliminando a utilização de lupa esteriomicroscópica para manipular oócitos no dia da execução do teste; 3) É viável reduzir o tempo de co-incubação de oócitos e espermatozóides para 6 horas, desde que a concentração espermática utilizada seja de 2×10^6 espermatozóide para cada ml de meio de fecundação utilizado; 4) O diagnóstico de paternidade revelou que ao inseminar fêmeas suínas com um *pool* de sêmen de quatro machos, utilizando dose inseminante de $2,8 \times 10^9$ espermatozóides, todos os machos tiveram participação semelhante na taxa de paternidade dos leitões nascidos.

Palavras-chave: Teste de penetração espermática *in vitro*, criopreservação de oócitos, diagnóstico de paternidade, suínos.

Abstract

MACEDO JR, Milton Carvalho. ***In vitro* penetration test using oocytes and *in vivo* fertility after heterospermic insemination in swine.** 2007. 98f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Agrícola. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

The knowledge of the reproductive potential of a male is of economic and reproductive importance, mainly if used in programs of artificial insemination. The conventional tests for semen quality evaluation do not have the capacity to measure the fertilizing potential of a sample, although they indicate if that one is fertile or not. The *in vitro* penetration test, appears in this context as an alternative laboratorial test to categorize of males capacity of fecundation, as mimics *in vitro* what happens *in vivo*. However this test has its use limited for difficult execution and high cost. With the objective to simplify the test, the present work evaluated alternatives for reduction of the execution time, use of cryopreserved oocytes in different methods and its association with *in vivo* fertility through heterospermic insemination and following diagnostic fertility. It was concluded that: 1) It is possible to use the incubation system *BOTTLE*, to replace the conventional incubation system, eliminating the need for using expansive CO₂ incubator; 2) Oocytes can be cryopreserved in *CRIOVIAL*, together with the medium of fecundation and mineral oil, eliminating the use of stereoscopic lupa to manipulate oocytes in the day of the execution of the test; 3) It is viable to reduce co-incubation time of oocytes and sperm for 6 hours, if sperm concentration is of 2×10^6 per ml of way of used fecundation; 4) The paternity diagnosis disclosed that when inseminating females swine with one *pool* of semen of four males, using a dose of $2,8 \times 10^9$ spermatozoa, all the males had the same participation in the paternity of the produced pigs.

Key-Words: *In vitro* penetration test, oocyte cryopreservation, paternity test, swine.

Lista de Tabelas

Artigo 1

Tabela 1: Efeito do sistema de incubação sobre o número médio de espermatozóides que penetraram por oócito (NMEPO), agrupando o resultado de todos os machos..... 49

Tabela 2: Efeito da interação entre macho e sistema de incubação sobre o número médio de espermatozóides que penetraram por oócito (NMEPO) 49

Tabela 3: Taxas de penetração *in vitro* por sistema de incubação e por macho 50

Tabela 4: Efeito da interação entre macho e tratamento sobre a taxa de penetração *in vitro*, considerando como referência a combinação de diferentes machos com o sistema de incubação em *ESTUFA** 51

Tabela 5: Efeito da interação entre macho e tratamento sobre a taxa de penetração *in vitro*, considerando como referência a combinação de diferentes machos com o sistema de incubação em *BAG** 53

Tabela 6: NMEPO em função do sistema de congelamento e macho utilizado.. 54

Tabela 7: Taxas de penetração *in vitro* em função do tratamento e do macho utilizado 54

Tabela 8: Efeito da interação entre macho e tratamento sobre a taxa de penetração <i>in vitro</i> , considerando como referência a combinação de diferentes machos com o sistema de congelamento OPS*	55
---	----

Artigo 2

Tabela 1: Características dos <i>primers</i> utilizados nas PCR	78
---	----

Tabela 2: TPIV e significância estatística em modelos de regressão logística para diferentes concentrações espermática e tempo de co-incubação de gametas obtidos por diferentes machos.	81
---	----

Tabela 3: Número médio de espermatozóide que penetram por oócitos para diferentes machos e tratamentos	82
--	----

Tabela 4: Estatística descritiva do diagnóstico de paternidade	83
--	----

Tabela 5: Identificação de paternidade obtida pelos diferentes machos	83
---	----

Tabela 6: Taxa de penetração espermática <i>in vitro</i> e número médio de espermatozóides que penetram por oócitos obtido por diferentes machos	84
--	----

Lista de Abreviaturas e Siglas

Ácido desoxiribonucleico: DNA

Ácido Etileno Diamino Tetraacético: EDTA

Albumina Sérica Bovina: BSA

Beltsville Thawing Solution: BTS

Desoxinucleotídeos trifosfatados: dNTP

Dimetilsulfóxido: DMSO

Dulbecco Phosphate Buffered Saline: DPBS

Etilenoglicol: EG

Fertilização *in vitro*: FIV

Horas: h

Inseminação Artificial: IA

International Society for Animal Genetics: ISAG

Micras: μm

Mililitro: mL

Molar: M

Nitrogênio Líquido: N₂L

Número médio de espermatozóide que penetram por oócito: NMEPO

Open Pulled Straw: OPS

Par de base: Pb

Pequenas repetições em tandem: STR

Reação em cadeia da Polimerase: PCR

Seqüência Simples repetida: SSR

Solução de Congelamento 1: SC1

Solução de Congelamento 2: SC2

Solução de Vitrificação 1: VS1

Solução de Vitrificação 2: VS2

Soro fetal bovino: SFB

Taxa de penetração espermática *in vitro*: TPIV

Tissue Culture Médium: TCM

Tratamento = T

Sumário

Resumo.....	06
Abstract.....	07
Lista de tabelas.....	08
Lista de abreviaturas e Siglas.....	10
Sumário.....	12
Introdução Geral.....	13
Revisão de Literatura.....	16
Referências Bibliográficas.....	28
Artigo 1: Avaliação de sistemas de criopreservação de oócitos e co- incubação de gametas no teste de penetração espermática in vitro.....	35
Introdução.....	37
Material e Métodos.....	40
Resultados.....	48
Discussão.....	55
Conclusão.....	60
Referências Bibliográficas.....	61
Artigo 2: Teste de penetração espermática in vitro em oócitos e fertilidade in vivo após inseminação heterospérmica e identificação genética da paternidade na espécie suína.....	66
Introdução.....	68
Material e Métodos.....	70
Resultados.....	79
Discussão.....	84
Conclusão.....	89
Referências Bibliográficas.....	90
Conclusões Gerais.....	97

Introdução Geral

A predição da habilidade fertilizante é de grande importância econômica, principalmente em rebanhos que utilizam a técnica de inseminação artificial (IA), permitindo a seleção apenas de reprodutores com bom desempenho reprodutivo (Gadea, 2005). Novas técnicas de IA surgiram nos últimos anos, como a IA pós-cervical ou intra-uterina, recomendada para fêmeas suínas com mais de um parto, o que possibilita a utilização de doses inseminantes entre um sexto (Mezalira *et al*, 2005; Serret *et al*, 2005) e um terço (Watson e Behan *et al*, 2002) da concentração de espermatozóides, recomendada na técnica de IA intracervical (Alm *et al*, 2006). A outra técnica de IA com potencial de utilização é da intra-uterina profunda, realizada com auxílio de um cateter flexível especial (Martinez *et al*, 2001; Roca *et al*, 2003; Vasquez *et al*, 2003). Por este motivo, existe a necessidade de identificar reprodutores suínos e ou ejaculados que tenham maior fertilidade, pois as novas técnicas de IA utilizam doses inseminante com concentrações reduzidas de espermatozóides.

Até o presente momento as centrais de inseminação utilizam métodos de avaliação seminal que nem sempre identificam os machos que possuem maior potencial fertilizante. Embora avaliações de características como concentração espermática, morfologia e motilidade possam ser usadas para identificar macho com baixo desempenho reprodutivo, muitas vezes elas não são válidas para identificar diferencial de fertilidade em machos com índices seminais considerados aceitáveis (Xu *et al*, 1998), pois não avaliam por completo a funcionalidade da célula espermática.

As características funcionais dos espermatozóides são aquelas necessárias para a obtenção de sucesso na interação com o trato reprodutivo da fêmea, ligação ao oócito e fertilização. Para isso, o espermatozóide necessita possuir uma morfologia bem definida, motilidade progressiva, habilidade de sofrer alterações na membrana (capacitação), reconhecer receptores na zona pelúcida, realizar fusão das membranas para parcial exocitose (reação acrossômica) e por último, fusão do oócito ao oolema durante a fertilização (Rodriguez-Martinez *et al*, 1998). No entanto, estas características não são completamente avaliadas pelos testes convencionalmente utilizados, pois embora alguns reprodutores sub férteis possuam alterações espermáticas bastantes características, outros possuem motilidade e morfologia normal (Miller, 1999).

Entre os testes que medem a capacidade fertilizante *in vitro*, e possuem interação como a zona pelúcida, estão os testes de ligação espermática a zona pelúcida (Fazeli *et al*, 1995; Braundmeier *et al* 2004; Waberski *et al*, 2005), penetração espermática *in vitro* (Ivanova & Mallova, 1993) e produção *in vitro* de embriões (Long *et al*, 1999, Sánchez-Ruiz *et al*, 2006).

Em teoria, os testes de penetração em zona pelúcida indicam uma sub população de espermatozóides capazes de reconhecer e ligar à zona pelúcida, sofrer a reação acrossômica e transpor a zona pelúcida em um intervalo definido de tempo (Waberski *et al*, 2005). Estes testes têm recebido atenção especial, pois fornecem uma completa informação de todos os estágios da penetração espermática (Martinez *et al*, 1993), além de possuir maior capacidade de identificar alterações no espermatozóide quando comparado aos testes de motilidade, morfologia, choque hiposmótico, termo resistência (Macedo *et al*, 2006) e o teste de avaliação da reação acrossomal (Vasquez *et al*, 1997). Embora existam muitos trabalhos mostrando a eficácia do teste de penetração espermática *in vitro* (Ivanova & Mallova 1993; Martinez *et al*, 1993; Gadea *et al*, 1998; Macedo *et al*, 2006), este é pouco utilizado devido a complexidade de sua execução, demanda de tempo e do custo dos equipamentos necessários. Além disso, a penetrabilidade de oócitos suínos por espermatozóides é influenciada

por vários fatores e, alguns ainda não estão bem esclarecidos. Somente com o conhecimento de diferentes componentes celulares envolvidos na penetração espermática será possível simplificar métodos de fertilização *in vitro* (Campos *et al*, 2001) e fazer com que os resultados possuam maior repetibilidade.

O objetivo do presente trabalho foi determinar alternativas para simplificação do teste de penetração espermática *in vitro*, avaliando diferentes sistemas e períodos de incubação, formas de congelamento de oócitos, concentração espermática e a associação do conjunto desses fatores e sua relação com fertilidade *in vivo*.

Revisão de Literatura

Esta revisão teve o objetivo de identificar fatores que interferem no teste de penetração espermática *in vitro*.

Efeito das células do *cumulus oophorus* sobre a penetrabilidade do oócito

Pesquisas realizadas por Matas *et al* (1996) para verificar o efeito das células do *cumulus oophorus* em oócitos imaturos sobre a penetração espermática *in vitro*, não observaram diferença na porcentagem de oócitos penetrados e no número de espermatozóide que penetram por oócitos, independentemente se os oócitos possuíam células do *cumulus oophorus* ou eram desnudos (sem células do *cumulus oophorus*). Contudo, quando as células do *cumulus oophorus* foram retiradas mecanicamente, a porcentagem de oócitos degenerados foi maior do que quando os oócitos foram espontaneamente desnudos ou quando estavam com as células do *cumulus oophorus*. Diferentemente do que acontece em oócitos suínos maturados, as células do *cumulus oophorus* em oócitos imaturos de suínos não possuem efeito sobre a penetração espermática *in vitro*. Ao estudar a influência destas células na capacidade de penetração de espermatozóides em oócitos, Campos *et al* (2001) verificaram que oócitos maturados com células do *cumulus oophorus* apresentaram maior taxa de penetração e maior número de espermatozóides que penetram por oócitos que oócitos imaturos com células do *cumulus oophorus*. Diferentemente de Matas *et al* (1996), Campos *et al* (2001) verificou que oócitos imaturos desnudados, possuem uma taxa de penetração maior que oócitos

imaturos com células do *cumulus oophorus*, porém esta diferença não foi evidenciada quando os oócitos eram maduros. Neste mesmo experimento, os autores concluíram que o número médio de espermatozóide que penetram por oócito em oócitos imaturos é menor do que os encontrados em oócitos maduros e com presença das células do *cumulus oophorus*. Isto provavelmente acontece em função de existência de proteínas nas células do *cumulus oophorus* expandido de oócitos maduros, que são capazes de induzir ou promover a reação acrossômica de espermatozoides suínos, favorecendo a penetração espermática (Boatman & Robbins, 1991; Mاتيoli *et al*, 1998).

Influência do tempo e da forma de preservação de ovário e oócito no teste de penetração espermática *in vitro*

Uma das dificuldades de execução do teste de penetração espermática *in vitro* é a necessidade de obter oócitos sempre que o teste for realizado. Vários autores demonstraram ser possível utilizar ovários ou oócitos armazenados por curto período de tempo, no entanto, os resultados são variáveis em função da técnica empregada.

Recentemente, Macedo *et al* (2006) demonstraram que as taxas de penetração espermática utilizando oócitos frescos ou vitrificados não diferiram entre si, quando comparadas dentro do mesmo sistema de incubação. Desta forma, é possível realizar a formação de um banco de oócitos previamente vitrificados para ser utilizado no teste, diminuindo as dificuldades de execução do mesmo e, permitindo que seja realizado em locais onde não há abatedouros próximos. Uma forma alternativa de estocar oócitos é através do emprego de soluções hipersaturadas (Yanagimachi *et al*, 1979), contudo, Lynham & Harrison (1998), observaram que as zonas pelúcidas dos oócitos estocados nestas soluções sofrem alterações progressivas com o passar do tempo, tornando-as praticamente impenetráveis aos espermatozoides ao redor dos 70 dias de estocagem. No entanto, o mesmo não foi observado, quando os autores utilizaram oócitos congelados em solução com 10% de dimetilsulfóxido em soro

fetal bovino e, estocados em nitrogênio líquido por até 332 dias, embora tenha havido uma diminuição do número de espermatozóides que penetraram nos oócitos, em aproximadamente 30%, quando comparado com os resultados obtidos utilizando oócitos de oito e 332 dias de armazenagem.

Utilizando oócitos oriundos de ovários congelados (-196 °C) por até três meses, Tatemoto *et al* (1994) concluíram que os mesmos podem ser utilizados em teste de penetração espermática, para assegurar a capacitação e a reação acrossômica de sêmen de touros. Entretanto, não foi investigada uma associação entre a taxa de penetração *in vitro* e fertilidade *in vivo*, além de ser evidenciado que a taxa de penetração foi menor para oócitos oriundos de ovários congelados em comparação com as taxas obtidas com oócitos frescos maturados *in vitro* (grupo controle), quando a concentração de espermatozóides utilizado foi igual ou menor a 5×10^6 espermatozóide para cada mL de meio de fecundação.

Holst *et al* (2000) avaliaram a capacidade de ligação de espermatozóides canino utilizando oócitos homólogos frescos e estocados em solução hipersaturada ou oriundo de ovários congelados, e concluíram que a capacidade de ligação espermática foi maior em oócitos frescos que nos oócitos estocados.

Relação entre o diâmetro do oócito e a penetração espermática *in vitro*

O diâmetro do oócito interfere diretamente no teste de penetração espermática *in vitro*. Matas *et al* (1996) demonstraram que oócitos com 116 µm (micra) de diâmetro obtiveram um percentual de penetração significativamente maior que os oócitos de menor diâmetro. Grupos de oócitos com até 104 µm de diâmetro foram penetrados por menos espermatozóides que grupo de oócitos com diâmetro entre 105 à 115 µm, o que por sua vez, foram penetrados por menos espermatozóides que o grupo de oócitos maiores que 116 µm. A diferença na penetrabilidade de oócitos de diferentes diâmetros esta relacionada a variações na zona pelúcida, receptores espermáticos e diferenças nas

propriedades elásticas e imunológicas que ocorrem durante o desenvolvimento oocitário (Matas *et al*, 1996). Entretanto, não são encontrados na literatura trabalhos publicados que classificam os oócitos pelo tamanho, mas apenas pelo tamanho dos folículos puncionados. Lucas *et al* (2003) confirmaram em seu experimento a influência do diâmetro do oócito e sua penetrabilidade a espermatozóides, concluindo que é o tamanho folicular que influencia diretamente a penetrabilidade do oócito e que oócitos de igual tamanho, mas originados de folículos de tamanhos diferente apresentam diferente penetrabilidade e, apontam os oócitos puncionados de folículos maiores que 2,2 mm de diâmetro como sendo os mais indicados para serem utilizados no teste de penetração espermática *in vitro* na espécie suína.

Estágio de maturação oocitária sobre o teste de penetração espermática *in vitro*

Existe uma grande variação nas taxas de penetração espermática, de polispermia e no número médio de espermatozóides (NMEPO) em função do estágio de maturação do oócito e do sistema de cultivo (Coy *et al*, 1999). Além disso, diferentes autores reportaram diferentes resultados. Wang *et al* (1994) reportaram que oócitos suínos desnudos e em estágio de vesícula germinativa, bem como aqueles em maturação, são igualmente penetrados *in vitro* por espermatozóides criopreservados, mas que não há penetração em oócitos intactos (com células do *cumulus oophorus*) em estágio de vesícula germinativa. Contudo, Martinez *et al* (1993) demonstraram que oócitos imaturos de suínos podem ser usados no teste de penetração espermática *in vitro* e que a taxa de penetração espermática *in vitro* e o número médio de espermatozóides que penetram por oócito não diferem para oócitos imaturos ou maduros. Campos *et al* (2001) obtiveram resultados que divergem dos resultados obtidos por Martinez *et al* (1993) e justificaram que aqueles resultados foram influenciados pela alta concentração espermática utilizada naquele experimento, o que mascarava as diferenças existentes.

Efeito do macho sobre o teste de penetração espermática *in vitro*

As taxas de polispermia e penetração espermática *in vitro* em suínos são amplamente afetadas por variações individuais entre machos, o que sugere que diferentes machos respondem diferentemente à fertilização *in vitro* e outros testes também, o que pode ser relacionado com a fertilidade *in vivo* (Xu *et al*, 1998; Gadea *et al*, 1998). No entanto, existe interação entre macho e determinados testes (Popweel & Flowers, 2004), macho e tratamentos (Macedo *et al*, 2006) e até mesmo diferenças na fertilidade de diferentes ejaculados de um mesmo macho (Hammerstedt, 1996), e ou diferentes frações de um mesmo ejaculado (Xu *et al*, 1996), dificultando que seja estabelecida uma associação entre os resultados dos testes e a real capacidade fertilizante *in vivo*.

Influência da origem do oócito sobre o teste

Oócitos oriundos de diferentes grupos interagem diferentemente com os espermatozóides, podendo proporcionar comparações menos reais. Para obter um resultado acurado é fundamental minimizar a variabilidade entre oócitos e não utilizar um número excessivo de espermatozóides (Braunmeier & Miller, 2001). Hermansson *et al* (2006), avaliaram o efeito de seis diferentes réplicas de oócitos caninos no teste de ligação espermática à zona pelúcida, utilizando um *pool* de sêmen congelado e, verificaram que o número de espermatozóides ligados à zona pelúcida foi diferente entre as réplicas, o que segundo Mahadevan *et al* (1987), pode se explicado por alterações nas glicoproteínas de superfícies da zona pelúcida durante o processo de maturação e atresia.

Para reduzir a variabilidade entre oócitos pode ser usado um teste competitivo, no qual espermatozóides de diferentes machos são corados com diferentes fluoróforos, misturados e colocados na mesma gota de fecundação permitindo que compitam pelos mesmos oócitos (Miller *et al*, 1998), ou bipartir a zona pelúcida e mensurar a habilidade de ligação a hemi-zona de uma amostra comparando-a com a habilidade de ligação de um sêmen controle na hemi-zona restante, em gotas separadas (Oehninger *et al.*, 1989).

Influência do tratamento do espermatozóide na penetração espermática *in vitro*

Previamente ao processo de fertilização *in vitro* o sêmen é centrifugado e os espermatozóides ressuspensos, com o objetivo de retirar as proteínas decapacitantes presentes no plasma seminal.

Almiñana *et al* (2005) reportaram que a maioria dos protocolos de fertilização *in vitro* em suínos utilizam cafeína, que é responsável por um aumento na motilidade espermática, estímulo a capacitação e reação acrossômica espontânea e, que pode estar relacionada a altas taxas de polispermia na produção *in vitro* de embriões suínos. Funahashi *et al* (2000, 2001) e Almiñana *et al* (2005), demonstraram ser possível regular a penetração polispérmica em suínos utilizando adenosina, no entanto estes artifícios não podem ser usados no teste de penetração espermática *in vitro* já que o objetivo do teste é avaliar a capacidade que o espermatozóide tem de penetrar em um oócito e, neste caso, a polispermia estaria relacionada positivamente com a fertilidade *in vivo* (Gadea *et al* 1998). No entanto, no teste de penetração espermática *in vitro*, o grande desafio é identificar um protocolo que proporcione iguais condições de expressão da capacidade fertilizante para todas as amostras, o que não vem sendo considerado nos trabalhos publicados.

Com o objetivo de avaliar a influência de lavagem seminal sobre a produção *in vitro* de embriões suínos, Choi *et al* (1995), concluíram que oócitos inseminados com espermatozóides pré-incubados em solução DPBS (Dulbecco's phosphate buffered saline), apresentaram uma taxa de fertilização significativamente maior do que oócitos inseminados com espermatozóides pré incubados em solução BO (Brackett & Oliphant medium). Matas *et al* (1996), relatam que existe influência do tratamento espermático sobre a taxa de fertilização *in vitro*, pois avaliaram a taxa de penetração espermática e o NMEPO após inseminação *in vitro* utilizando espermatozóides lavados em solução salina e pré incubados em TCM 199, ou inseminados diretamente, sem qualquer tratamento. Estes autores concluíram que a penetrabilidade dos oócitos variou amplamente, independentemente do tratamento espermático. Entretanto, os

resultados do teste tiveram maior repetibilidade entre as réplicas quando os espermatozóides não sofreram lavagem e pré incubação. Segundo os autores, os tratamentos de lavagem seminal utilizados no processo de centrifugação, comprometem a integridade da membrana plasmática de até 35% dos espermatozóides que os espermatozóides suínos são influenciados não somente pelo doador do sêmen, mas também pela manipulação espermática e, ainda que ejaculados de um mesmo macho provavelmente reajam diferentemente ao mesmo tratamento de capacitação. Os mesmos autores sugerem que se o tratamento de capacitação pode aumentar a susceptibilidade do espermatozóide de um mesmo macho a subseqüentes danos de membrana, e que o uso de espermatozóides não lavados e não pré-incubados pode diminuir a variabilidade entre réplicas. Entretanto, este grupo de pesquisa não usou esse protocolo em trabalhos posteriores (Gadea *et al* 1998; Coy *et al*, 1999; Campos *et al*, 2001; Lucas *et al*, 2003).

Influência do sistema de incubação sobre a penetração espermática *in vitro*

Um dos fatores limitantes para a execução do teste de penetração espermática *in vitro* é o sistema de co-incubação oócito-espermatozóide. Até recentemente todos os trabalhos publicados tinham utilizado a estufa de CO₂ como sistema de incubação, no entanto a estufa é um equipamento caro e de difícil locomoção, limitando a execução do teste fora de centros de pesquisa. Macedo *et al* (2006) adaptaram a técnica de incubação submarina desenvolvida por Vajta *et al* (1997) para a produção *in vitro* de embriões e, verificaram que é possível utilizar este modelo de incubação para execução do teste desde que se utilize oócitos frescos e, sugeriram que aperfeiçoando o sistema, este modelo pode ser usado até mesmo quando os oócitos forem vitrificados/descongelados. As vantagens de se utilizar o sistema submarino é que é mais econômico que o sistema convencional (estufa) e é portátil, podendo ser transportado sem qualquer dificuldade.

Efeito do tempo de incubação de espermatozóides e oócitos sobre a penetração espermática *in vitro*

O tempo de co-incubação entre espermatozóides e oócitos e a concentração espermática afetam diretamente a penetração espermática *in vitro*, interferindo na porcentagem de oócitos fertilizados, na porcentagem de fertilização monospermica, na porcentagem de blastocistos produzidos e na eficiência da produção de embriões *in vitro* (Dode *et al*, 2002). No teste de penetração espermática, o tempo de co-incubação entre espermatozóides e oócitos e a concentração espermática influenciam na taxa de penetração e no número médio de espermatozóides penetrados por oócitos (Tatemoto *et al*, 1994).

A maioria dos protocolos de produção *in vitro* de embriões bovinos utilizam 18h de co-incubação oócito-espermatozóide, embora após 10h (Ward *et al*, 2002) ou 12h (Dode *et al*, 2002) de co-incubação não ocorra um incremento na porcentagem de oócitos penetrados. Lin *et al* (2000) demonstraram na espécie humana, que a incubação de oócitos-espermatozóide por 3h produz a mesma porcentagem de embriões de boa qualidade que a co-incubação por 16 à 18h de, que rotineiramente é utilizada. Na espécie suína os protocolos de produção *in vitro* de embriões suínos deixam oócitos e espermatozóide co-incubados por 6h, pois períodos superiores aumentam a porcentagem de polispermia e reduzem a produção de embriões viáveis (Xu *et al*, 1998; Coy *et al* 1993). Contudo no teste de penetração espermática *in vitro*, o período de co-incubação oócito-espermatozóide é de 18 h, embora Coy *et al* (1993) tenham demonstrado que com 8 h de co-incubação pode levar a fertilização de 93,9% dos oócitos. Desta forma, seria possível diminuir o tempo de incubação, sem afetar a taxa de penetração, diminuindo o período de execução em até 12 h. Tatemoto *et al* (1994) obtiveram 87,6% de penetração espermática em oócitos bovinos co-incubados por apenas 1 h quando a concentração espermática foi de 10×10^6 espermatozóide por mL de meio de fecundação. Recentemente, Hermansson *et al* (2006) mostraram que 1h de co-incubação é suficiente para testar sêmen canino fresco ou resfriado utilizando o teste de ligação à zona pelúcida, o que mostra ser possível diminuir o tempo de execução dos testes.

Oócitos suínos co-incubados com espermatozóides por um período que variou entre 10min e 6h (controle) apresentaram a mesma taxa de penetração espermática. Surpreendentemente, o NMEPO tenha sido maior quando o período de co-incubação foi de 10 e 30min, do que quando co-incubação foi 6h (Gil *et al*, 2004). No entanto, em suínos, diferentes períodos de co-incubação não têm sido testados nos trabalhos que avaliam a relação da fertilidade *in vitro* e *in vivo*, embora as pesquisas acima citadas indiquem ser possível diminuir o período de incubação no teste de penetração espermática *in vitro*.

Efeito das células epiteliais do oviduto suíno sobre penetração espermática *in vitro*

O oviduto fornece um ambiente que facilita, ou que pode ser essencial para a capacitação espermática, fertilização e desenvolvimento embrionário inicial *in vivo* (Buhi, *et al*, 1993). Após o processo de monta natural ou inseminação artificial, os espermatozóides são transportados para o oviduto onde interagem com as células epiteliais e forma um reservatório espermático onde os espermatozóides são contidos até o momento próximo a ovulação, quando alguns são liberados para interagir com os oócitos (Suarez, 1987).

Romar *et al* (2001), demonstraram *in vitro*, que oócitos imaturos de suínos na presença das células epiteliais do oviduto sofreram uma maior taxa de penetração espermática e foram penetrados por um número médio de espermatozóides maior que os oócitos do grupo controle (sem células do epiteliais do oviduto). O mesmo aconteceu quando utilizaram oócitos maturados *in vitro* e sêmen congelado, demonstrando que a secreção do oviduto interfere na interação dos gametas masculino e feminino, independente do estágio de maturação do oócito ou da natureza espermática (fresco ou congelado/descongelado) e, que estas células podem influenciar na identificação *in vitro* da capacidade fertilizante dos espermatozóides e, no entanto, é mais um fator que interfere no resultado dos testes de penetração espermática *in vitro*, mas que não tem sido considerado.

Inseminação heterospérmica e identificação de paternidade utilizando marcadores de DNA

A fertilidade entre machos difere em função de variações individuais, como idade, efeitos sanitários ou efeitos ambientais como temperatura e estação do ano (Dziuk, 1996), práticas de manejo (Vicente *et al*, 2004), diferenças na libido, desempenho de cobertura, número de espermatozóide por ejaculado (Berger, 1995) e habilidade do inseminador. Embora exista uma ampla variedade de testes laboratoriais que objetivam presumir a fertilidade *in vivo* de um reprodutor ou uma amostra, muitas vezes os resultados obtidos nestes testes não são associados com fertilidade *in vivo*, além de existir muita contradição entre trabalhos publicados. Fertilização competitiva ou inseminação heterospérmica é um processo no qual espermatozóides de mais de um reprodutor, ou espermatozóides de um mesmo reprodutor tratado diferentemente são combinados, eliminando as variáveis associadas com inseminação homospérmica, já que os espermatozóides competem na mesma fêmea (*in vivo*) ou na mesma placa de fecundação (*in vitro*) (Foote, 2003). Comparado com inseminação artificial homospérmica, a inseminação heterospérmica é um mecanismo mais eficiente para estimar resultado da capacidade fertilizante e elimina as variações inerentes a fertilidade homospérmica.

A identificação da paternidade de progênie originadas de inseminação heterospérmica pode ser realizada através da seleção de reprodutores com pelagens diferentes para compor o *pool* (Berger, 1995), tipagem sanguínea (Bowling, 1997), utilização de corantes marcadores de espermatozóides que não afetam a motilidade (Miller *et al*, 1998), associação da conformação e forma corporal da progênie e prováveis progenitores (Dziuk, 1996) e a amplificação de microssatélites marcadores (Stahlberg *et al*, 2000).

Embora características fenotípicas possam ser usadas para identificar paternidade, a falta de diferenças conclusivas, em alguns casos, e o longo período de gestação limitam a eficiência desta técnica, já que muitas vezes a

detecção da paternidade é desejada logo após a fertilização (Stahlberg *et al*, 2000). A identificação de marcadores de DNA e a caracterização do seu polimorfismo em diferentes espécies tem sido utilizada para identificar a paternidade após inseminação heterospermica, utilizando reprodutores sem diferenças fenotípicas evidentes (Vicente *et al*, 2004). A utilização de marcadores genéticos é uma possibilidade para detectar machos férteis e sub-férteis e estabelecer correlação com parâmetros espermáticos observados em sêmen fresco ou congelado (Vicente *et al*, 2004). Este desenho experimental aumenta em pelo menos 10 vezes a eficiência de mensuração da fertilidade de diferentes machos, reduzindo enormemente o número de observações e o custo requerido para alcançar o nível de significância estatística desejada. No entanto, este modelo tem sido subutilizado para classificar reprodutores com base em fertilidade (Foote, 2003).

Microsatélites marcadores, também conhecidos como *short tandem repeats*, *short sequence repeats* (SSR) ou *sequence tagged microsatellite sites* (STMS) contem repetidas seqüências compostas de 2 a 6 nucleotídeos e quando comparados com marcadores sanguíneos convencionais (grupos sanguíneos e proteínas polimórficas), o uso de microsatélites amplamente polimórficos aumenta a probabilidade de exclusão e a porcentagem de correta identificação de parentesco (Putnová *et al*, 2003). Para diminuir o tempo de execução e as chances de erro, é possível proceder as reações em cadeia da polimerase (PCR) utilizando vários *primers* marcados (corados) na mesma reação, caracterizando a reação multiplex, e a subsequente avaliação dos fragmentos amplificados com auxílio de um seqüenciador de DNA e software especializado, possibilitando inclusive a utilização de diferentes *primers* que amplifiquem fragmentos de tamanhos iguais (Nechtelberger *et al*, 2001; Putnová *et al*, 2003; Panzardi, 2006). A tecnologia de identificação de paternidade utilizando microsatélites não é dependente da existência de seqüenciador de DNA e softwares, pois é possível realizar identificação dos fragmentos gerados na PCR através de eletroforese em gel de acrilamida seguido de coloração em prata (Stahlberg, 2000; Cesconeto, 2003;), embora seja um processo mais

demorado e menos preciso. Neste contexto a inseminação heterospérmica seguida de uma correta identificação de paternidade é apresentada como uma excelente ferramenta de diagnóstico de fertilidade.

Conclusão

Há um grande empenho da comunidade científica na tentativa de identificar testes laboratoriais que tenham capacidade de associar desempenho espermático *in vitro* e fertilidade *in vivo*. Entretanto, o grande número de variáveis que não são controladas, por dificuldade de execução, pelo desconhecimento de alguns mecanismos celulares, pela influência de determinados constituintes das soluções utilizadas na interação oócito-espermatozóide, diferentes desenho experimentais utilizados e análise estatística, os resultados apresentados algumas vezes são contraditórios. No entanto, o conhecimento dos fatores que interferem nos resultados, associado a simplificação na execução dos testes, diminuindo custo e tempo, são elementos fundamentais para a identificação de um teste capaz de predicar *in vitro* a real capacidade fertilizante *in vivo* de um ejaculado ou parte dele.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALM, K; PELTONIEMI, O. A. T; KOSKINEN, E.; ANDERSON, M. Porcine field fertility with two different insemination doses and the effect of sperm morphology. **Reproduction Domestic Animal**, 41, 210–213, 2006.

ALMIÑANA, C.; GIL, M. A.; CUELLO, C.; ROCA, J.; VAZQUEZ, J. M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; MARTINEZ, E. A. Adjustments in IVF system for individual boars: Value of additives and time of sperm-oocyte co-incubation. **Theriogenology**, v.64, p. 1783-1796, 2005.

BERGER, T. Proportion of males with lower fertility spermatozoa estimated from heterospemic insemination. **Theriogenology**, v.43, p. 769-775, 1995.

BOATMAN, D.; ROBBINS, R. Detection of a soluble acrossome reaction-inducing factor, different from serum albumin, associated with the ovulated eggs-cumulus oophorus complex. **Molecular Reproduction Development** v.30, p. 396-401, 1991.

BOWLING, A. T.; EGGLESTON-STOTT, M. L.; BYRNS, G.; DILEANIS, S.; WICTUM, E. Validation of microsatellite markers for routine horse parentage testing. **Animal Genetics**, v.28, p. 247-252, 1997.

BRAUNDMEIER, A G.; DEMERS, J M.; SHANKS, R D.; MILLER, D. J. The relationship of porcine sperm zona-binding ability to fertility. **Journal of Animal Science**, v.82, p. 452-458, 2004.

BRAUNDMEIER, A.; MILLER, D. J. The search on: Finding accurate molecular makers of male fertility. **Journal of Dairy Science**, v.84, p. 1915-1925, 2001.

BUHI, W. C.; O'BRIEN, B.; ALVAREZ, I. M.; ERDOS, G.; DUBOIS, D. Immunogold localization of porcine oviductal secretory proteins within the zona pellucida, perivitelline space, and plasma membrane of oviductal and uterine oocytes and early embryos. **Biology of Reproduction**, v.48, p.1274-1283, 1993.

CAMPOS, I.; COY, P.; ROMAR, R.; RUIZ, S.; GADEA, J. Effects of maturational stage, *cumulus oophorus* cells and coincubation of mature and immature *cumulus oophorus*-oocyte complexes on *in vitro* penetrability of porcine oocytes. **Theriogenology**, v.55, p. 1489-1500, 2001.

CESCONETO, R.J. Identificação de paternidade para a avaliação da contribuição da primeira e segunda dose inseminante na composição da leitegada suína. Dissertação (Mestre em Manejo Reprodutivo Animal). **Programa de Pós Graduação em Zootecnia**, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2003.

CHOI, Y.H.; SAITO, S.; IGYRU, N. *In vitro* development of porcine oocytes fertilized *in vitro* with spermatozoa preincubated in two different media. **Theriogenology**, v.44, p. 287-294, 1995.

COY, P.; RUIZ, R.; ROMAR, R.; CAMPOS, I.; GADEA, J. Maturation, fertilization and complete development of porcine oocytes matured under different systems. **Theriogenology**, v.51, p.799-812, 1999.

COY, P.; MARTINEZ, E.; RUIZ, S.; VAZQUEZ, J M.; ROCA, J.; MATAS, C. Sperm concentration influences fertilization and male pronuclear formation in vitro in pigs. **Theriogenology**, v.40, p.539-546, 1993.

DODE, M. A. N.; RODOVALHO, N. C.; UENO, V. G.; FERNANDES, C. E. The effect of sperm preparation and co-incubation time on *in vitro* fertilization of bos indicus oocytes. **Animal Reproduction Science**, v.69, p.15-24, 2002.

DZIUK, P. J. Factors that influence the proportion of offspring sired by a male following heterospermic insemination. **Animal Reproduction Science**, v.43, p. 65-88, 1996.

FAZELI, A. R.; HOLT, C.; STEENWEG, W.; BEVERS, M. M.; HOLT, W. V.; COLENBRANDER, B. Development of a sperm hemizona binding assay for boar semen. **Theriogenology**, v.44, p.17-27, 1995.

FOOTE, R. H. Fertility estimation: a review of past experience and future prospects. **Animal Reproduction Science**, v.75, p. 119-139, 2003.

FUNAHASHI, H.; FUJIWARA, T.; NAGAI, T. Modulation of function of boar spermatozoa via adenosine and fertilization-promoting peptide receptors

reduce the incidence of polyspermic penetration into porcine oocytes. **Biology of Reproduction**, v.63, p. 1157-1163, 2000.

GADEA, J.; MATÁS, C.; LUCAS, X. Prediction of porcine semen fertility by homologous *in vitro* penetration (hIVP) assay. **Animal Reproduction Science**, v. 56, p. 95-108, 1998.

GADEA, J. Sperm factors related to *in vitro* and *in vivo* porcine fertility. **Theriogenology**, v.63, p. 431-444, 2005.

GIL, M. A.; ABEYDEERA, L. R.; DAY, B. N.; VAZQUEZ, J. M.; ROCA, J.; MARTINEZ, E. Effect of the volume of medium and number of oocytes during *in vitro* fertilization on embryo development in pigs. **Theriogenology**, v.60, p. 767-776, 2003.

GIL, M. A.; JUAN, M. R.; VAZQUEZ, J. M.; ROCA, J.; DAY, B. N.; MARTINEZ, E. A. Effect of short periods of sperm-oocyte co incubation during *in vitro* fertilization on embryo development in pigs. **Theriogenology**, v.62, p.544-552, 2004.

HAMMERSTEDT, R. Evaluation of sperm quality: Identification of the subfertile male and courses of action. **Animal Reproduction Science**, v.42, p.77-87, 1996.

HERMANSSON, U.; PONGLOWHAPAN, S.; FORSBERG, C. L.; HOLST, B. S. A short sperm-oocyte incubation time ZBA in the dog. **Theriogenology**, v.66, p. 717-725, 2006.

HOLST, B.S., LARSSON, B., LINDE-FORSBERG. C., RODRIGUEZ-MARTINEZ. H., 2000b. Sperm binding capacity and ultrastructure of the zona pellucida of stored canine oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility* 119, 77-83.

IVANOVA, M.; MOLLOVA, M. Zona-penetration *in vitro* test for evaluation boar sperm fertility. **Theriogenology**, v.40, p. 397-410, 1993.

LIN, S-P., LEE, RK., SU, JT., LIN, M-H., HWU, Y-M. The effects of brief gamete co-incubation in human *in vitro* fertilization. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v.17, p. 334-348, 2000.

LONG, C.R.; DOBRINSKY, J.R.; JOHNSON, L. A. *In vitro* production of pig embryos: comparison of culture media and boars. **Theriogenology**, v.51, p.1375-1390, 1999.

LUCAS, C.; MARTÍNEZ, E. A.; ROCA, J.; VÁQUEZ, J. M.; GIL, M. A.; PASTOR, L. M.; ALABART, J. L. Influence of follicle size on the penetrability of

immature pig oocytes for homologous *in vitro* penetration assay. **Theriogenology**, v.60, p. 659-667, 2003.

LYNHAM, J. A.; HARRISON, R. A. P. Use of stored pig eggs to assess boar sperm fertilizing functions *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.58, p. 539-550, 1998.

MACEDO, JR. M.C.; DESCHAMPS, J.C.; LUCIA, JR. T.; BORDIGNON, J.; SERRET, C.; RAMBO, G.; PIVATO, I.; SCHMITT, E. *In vitro* penetration of fresh and vitrified swine oocytes by homologous spermatozoa using different incubation systems. **Animal Reproduction Science**, v.92, p. 334-348, 2006.

MAHADEVAN, M. M.; TROUSON, A. O.; WOOD, C.; LEETON, J. F. Effect of oocyte quality and sperm characteristics on the number of spermatozoa bound to the zona pellucida of human oocyte inseminated *in vitro*. **J. In vitro Fert. Embryo. Transfer.**, v.4, p. 223-227, 1987.

MARTINEZ, E.; VÁZQUES, J. M.; MATAS, C.; ROCA, J.; COY, P.; GADEA, J. Evaluation of boar spermatozoa penetrating capacity using pig oocytes at the germinal vesicle stage. **Theriogenology**, v.40, p. 547-557, 1993.

MARTÍNEZ, E. A.; VÁZQUEZ, J. M.; MATAS, C.; ROCA, J.; LUCAS, X.; GIL, M. A.; VASQUEZ, J. L. Deep intrauterine insemination and embryo transfer in pigs. **Reproduction Supplement**, v.58, p. 301-311, 2001.

MATAS, C.; MARTINEZ, E.; VÁZQUEZ, J. M.; ROTA, J.; GADEA, J. *In vitro* penetration assay of boar sperm fertility: Effect of various factors on the penetrability of immature pig oocytes. **Theriogenology**, v.46, p. 503-513, 1996.

MATIOLI, M.; BARBONI, B.; LUCIDI, P. Alternative Ca dependent acrossome reaction triggered by interaction between *cumulus oophorus* and integrin receptors. **Proc 50th ICAR**, Milan Italy, p. 572, Abstract, 1998.

MEZALIRA, A.; DALLANORA, D.; BERNARDI, M. L.; WENTZ, I.; BORTOLOZO, F.P. Influence of sperm cell dose and post-insemination backflow on reproductive performance of intrauterine inseminated sows. **Reproduction Domestic Animal**, v.40, p.1-5, 2005.

MILLER, D. J.; DEMERS, J. M.; BRAUNDMEIR, A. G.; BEHRENS, M. L. The use of two fluorescent dyes to identify sperm in a competitive binding assay to oocytes. **Journal of Andrology**, v.19, p. 650-656, 1998.

MILLER, D. J. A sperm's perspective of fertilization. **American Society of Animal Science**, p. 1-12, 1999.

NECHTELBERGER, D.; KALTWASSER, C.; STUR, I.; MEYER, J. N.; BREN, G.; MÜLLER, M.; MÜLLER, S. Ü. DNA Microsatellite analysis for parentage control in Austrian pigs. **Animal Biotechnology**, v.12, p. 141-144, 2001.

OEHNINGER, S.; CODDINGTON, C. C.; SCOTT, R.; FRANKEN, D. A.; BURKMAN, L. J.; COSTA, A. A.; HODGEN, G. D. Hemi zona assay: Assessment of sperm dysfunction and prediction of in vitro fertilization outcome. **Fertility and Sterility**, v. 51, p. 665-670, 1989.

PANZARDI, A. Determinação da paternidade de leitegadas suínas por marcadores microssatélites utilizando inseminação heterospermica, com deposição espermática intracervical e intrauterina, para a verificação da contribuição individual de machos suínos. Dissertação (Mestre em Área de concentração: Reprodução Animal). **Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária**, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas 2006.

POPWEEL, J. M.; FLOWERS, W. L. Variability in relationships between semen quality and estimates of *in vivo* and *in vitro* fertility in boars. **Animal Reproduction Science**, v.81, p. 91-113, 2004.

PUTNOVÁ, L.; KNOLL, A.; DVORAK, V.; DVORAK, J. A novel porcine microsatellite panel for the identification of individuals and parentage control in the Czech Republic. **Czech Journal of Animal Science**, v 48, p. 307-314, 2003.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H., LARSSON, B. Assessment of sperm fertilizing ability in farm animal. **Acta Agriculturae Scandinavia**, v.29, p. 12-18, (Suppl.) 1988.

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

ROMAR, R.; COY, P.; RUIZ, S.; GADEA, J.; RATH, D. Effects of oviductal and cumulus cells on in vitro fertilization and embryo development of porcine oocytes fertilized with epididymal spermatozoa. **Theriogenology**, V.59, p.975-986, 2003

SÁNCHEZ-RUIZ, A. L.; O'DONOGHUE.; NOVAK, S.; DYCK, M. K.; COSGROVE, JR.; DIXON, W. T.; FOXCROFT, G. R. The predicative value of routine semen evaluation and IVF technology for determining relative boar fertility. **Theriogenology**, v.66, p. 736-748, 2006.

SERRET, C. G.; ALVARENGA, M. V. F.; CÓRIA, A. L. P.; DIAS, C. P.; CORCINI, C. D.; CÔRREA, M. N.; DESCHAMPS, J.C.; BIANCHI, I.; LUCIA JR., T. Intrauterine artificial insemination of swine with different sperm concentrations, parities, and methods for prediction of ovulation. **Animal Reproduction**, v.2, p.250-256, 2005.

STAHLBERG, R.; HARLIZIUS, B.; WEITZE, K. F.; WABERSKI, D. Identification of embryo paternity using polymorphic DNA markers to assess fertilizing capacity of spermatozoa after heterospermic insemination in boars. **Theriogenology**, v.53, p. 1365 -1373, 2000.

SUAREZ, S .S. Sperm transport and motility in the mouse oviduct: observation in situ. **Biology of Reproduction**, v.36, p.203-210, 1987.

TATEMOTO, H.; HORIUHI, T.; MAEDA, T.; TERADA, T.; TSUTSUMI, Y. Penetration by bull spermatozoa into the zona pellucida of dead bovine oocytes recovered from frozen-thawed ovaries. **Theriogenology**, v.42, p. 465-474, 1994.

VAJTA, G.; HOLM, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. The submarine incubation system, a new tool for *in vitro* embryo culture: a technique report. **Theriogenology**, v.48, p.1379-1385, 1997.

VÁZQUEZ, J. M.; MARTINEZ, E. A.; MARTINEZ, P.; GARCIA-ARTIGA, C.; ROCA, J. Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analyzing the sperm membrane. **Theriogenology**, v.47, p. 913-922, 1997.

VAZQUEZ, J. M.; MARTINEZ, E. A.; PARRILLA, I. ROCA, J., GIL, M.A., VAZQUEZ, J.C. Birth of piglets after deep intrauterine insemination with flow cytometrically sorted boar spermatozoa. **Theriogenology**, v.59, p. 1605 –1614, 2003.

VICENTE, J. S.; CASTRO, M. P. V.; LAVARA, R.; MOCÉ, E. Study of fertilizing capacity of spermatozoa after heterospermic insemination in rabbit using DNA markers. **Theriogenology**, v.61, p.1357-1365, 2004.

WABERSKI, D.; MAGNUS, F.; MENDONÇA.; FERREIRA, F.; PETRUNKINA, A. M.; WEITZE, E.; TOPFER-PETERSEN, E. Importance of sperm-binding assays for fertility prognosis of porcine spermatozoa. **Theriogenology**, v.63, p.470-484, 2005.

WANG, W. H.; ABEYDEERA, L. R.; OKUDA, K.; NIWA, K. Penetration of porcine oocytes during maturation *in vitro* by cryopreserved, ejaculated spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.50, p. 510-515, 1994.

WARD, F.; ENRIGHT, B.; RIZOS, D.; BOLAND, M.; LONERGAN, P. Optimization *in vitro* bovine embryo production: Effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. **Theriogenology**, v.57, p. 2105-2117, 2002.

WATSON, P.F., BEHAN, J.R., 2002. Intrauterine insemination of sows with reduced sperm numbers: results of a commercially based field trial. **Theriogenology**, 48, 1683-1693.

XU, X.; DING, J.; SETH, P. C.; HARBISON, D. S.; FOXCROFT, G. R. *In vitro* fertilization of *in vitro* matured pig oocytes: effects of boar and ejaculate fraction. **Theriogenology**, v.45, p. 745-755, 1996.

XU, X.; POMMIER, S.; ARBOV, T.; HUTCHINGS, B.; SOTTI, W.; FOXCROFT, G. R. *In vitro* maturation and fertilization techniques for assessment of semen quality and boar fertility. **Journal of Animal Science**, v.76, p. 3079-3089, 1998.

YANAGIMACHI R: Mannlian fertilization. In: Knobil E, Neil J. The physiology of reproduction. **New York: Raven Press**, 1988;135-185.

YANAGIMACHI, R.; LOPAATA, R.; ODOM, C. B.; BRONSON, R. A.; MAHI, C. A.; NICOLSON, G. L. Retention of biologic characteristics of zona pellucida in highly concentrated salt solution: use of salt-stored eggs for assessing the fertilizing capacity of spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v.31, p. 562, 1979.

Artigo 1 - Avaliação de sistema de criopreservação de oócitos e co-incubação de gametas no teste de penetração espermática *in vitro*

M. C Macedo Jr., T. Lucia Jr., G. Rambo, E. B. Ferreira Filho, A. Rosa, C. Fabiane., M.

Cabral, J.C. Deschamps

Centro de Biotecnologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas

96010-900 Pelotas-RS, Brasil

(Artigo escrito segundo as normas da revista Animal Reproduction Science)

Resumo

O primeiro experimento teve como objetivo avaliar o efeito de três sistemas de co-incubação de oócitos e espermatozóides sobre o número médio de espermatozóides que penetraram por oócito (NMEPO) e taxa de penetração espermática *in vitro* (TPIV). Os sistemas testados foram: *ESTUFA*, *BAG*, e *FRASCO*. Neste experimento foram utilizados 937 oócitos divididos nos três tratamentos e agrupando o resultado gerado pela interação entre os quatro machos usados como doadores de sêmen e os três tratamentos. O NMEPO foi

6,3, 3,9, e 15,5 para os tratamentos *ESTUFA*, *BAG* e *FRASCO* respectivamente e, a TPIV variou de 70,8% a 98,6%. O teste LSD identificou diferença estatística ($P < 0,05$) entre os 3 tratamentos. A análise de regressão logística identificou que quando os machos B, C e D foram alocados no sistema de incubação *FRASCO*, apresentaram TPIV similares ($P > 0,05$) às apresentadas por eles próprios no tratamento *ESTUFA*, quando a interação de cada um deles com os tratamentos *ESTUFA* ou *BAG* foram consideradas nível de referência. O segundo experimento comparou o NMEPO e TPIV utilizando oócitos vitrificados pelo sistema *open pulled straw* (OPS) ou congelados em criotubo. Neste experimento foram avaliados 530 oócitos, e o teste de qui-quadrado revelou que apenas um macho, dos quatro utilizados, apresentou o NMEPO maior ($P > 0,05$) no tratamento onde os oócitos foram congelados em criotubos quando comparado aos oócitos vitrificados em OPS. Para os outros três machos o NMEPO foi igual para ambos os tratamentos. A TPIV variou entre 70,6% e 100%, mas a análise de regressão logística mostrou que a TPIV para três dos quatro machos utilizados no experimento não diferiu estatisticamente ($P < 0,05$), independentemente se os oócitos foram vitrificados ou congelados. Nos dois experimentos, a análise de regressão logística identificou a existência de um efeito diferencial dos tratamentos dependente do macho utilizado, contudo os resultados indicam que o sistema de incubação identificado como *FRASCO* pode ser utilizado em substituição ao tratamento *ESTUFA* e, o congelamento de oócitos utilizando *CRIOTUBO* pode ser utilizado em substituição a vitrificação de oócitos. A utilização de sistema de incubação *FRASCO* e congelamento de

oócitos em *CRIOTUBO* simplificam a execução do teste de penetração espermática *in vitro* e caracterizam avanços para que no futuro este teste possa ser realizados também em centrais de inseminação.

Palavras-chave: Teste de penetração espermática *in vitro*, criopreservação, oócitos, suínos.

1 Introdução

A utilização da inseminação artificial (IA) em suínos tem sido crescente, em função dos benefícios genéticos, econômicos e sanitários (Deschamps *et al.*, 1998). Como consequência, está ocorrendo um aumento nos programas de IA internos, aonde a coleta de sêmen e a IA são realizadas nas próprias granjas, bem como no número de centrais de IA, que comercializam sêmen e, portanto, no valor comercial dos machos. Neste contexto, o conhecimento da fertilidade de cada reprodutor passa a ser fundamental para obter bons índices reprodutivos.

Métodos de avaliação seminal são amplamente utilizados para estimar o potencial reprodutivo dos machos. Rotineiramente, a análise do ejaculado de um macho suíno selecionado para reprodução, é limitada às características como volume, motilidade, concentração e morfologia espermática. Porém tais características podem não medir a real capacidade fecundante dos espermatozóides e, a potencialidade reprodutiva do macho (Barth, 1992). Desta forma, é possível a sub-utilização de machos de alta capacidade fecundante ou o uso de machos de menor fertilidade. Estudos em animais domésticos mostram

que nem sempre os ejaculados que possuem as melhores características seminais são associados ao melhor desempenho reprodutivo (Linford *et al.*, 1976). Gadea *et al.* (2004), mostraram que em suínos, devido à pré-seleção e a eliminação de ejaculados de baixa qualidade, a alta concentração de espermatozóides por dose, utilizado em programas de IA, reduz a probabilidade de detectar diferenças na fertilidade através da avaliação de parâmetros seminais. Entre os métodos alternativos para estimar o potencial da capacidade fertilizante do sêmen suíno, os testes que medem a capacidade de penetração espermática ou fertilização *in vitro*, têm recebido atenção especial, pois fornecem informações de todos os estágios do processo de fertilização (Martínez *et al.*, 1993). Alguns destes testes tem demonstrado serem boas ferramentas para auxiliar na avaliação da capacidade de fertilização do sêmen suíno (Gadea *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 1998; Macedo *et al.*, 2006; Sanches- Ruiz *et al.*, 2006). Macedo *et al.* (2006) realizaram estes testes utilizando oócitos imaturos de suínos, criopreservados através da técnica de vitrificação (Saafeld *et al.*, 1997; Bertholot *et al.*, 2000; Vajta *et al.*, 1997a) e incubados em estufa de CO₂ ou em sistema “submarino”, adaptado de Vajta *et al.* (1997b). Neste trabalho realizado por Macedo *et al.* (2006) foi constatado que os testes de motilidade, morfologia espermática, choque hipoosmótico (chipo), e de termoresistência (TTR), não identificaram alterações nas células espermáticas que estão associadas à redução na capacidade de penetração, durante o período de armazenagem do sêmen diluído até 72h. O teste de penetração espermática *in vitro*, foi o único teste capaz de detectar perdas na funcionalidade espermática, sendo portanto,

mais sensível que os outros testes utilizados. Para implementar a utilização de oócitos vitrificados no teste de penetração espermática *in vitro*, os autores sugerem aperfeiçoamento no sistema de incubação submarino, eliminando, assim a necessidade de utilização da estufa de CO₂. Outro aprimoramento necessário é a diminuição do tempo de execução do teste e a simplificação do processo de armazenamento. Neste contexto, a utilização de criotubos, os quais, além dos oócitos criopreservados, poderiam conter solução de congelamento e óleo mineral, podendo constituir, um “*kit-TPIV*” comercial. Para a validação final do processo é necessário estabelecer a relação entre o teste de penetração espermática *in vitro*, utilizando oócitos vitrificados, e a fertilidade *in vivo* de machos suínos.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar alternativas para simplificação do teste de penetração espermática *in vitro*, através da realização de dois experimentos. No primeiro, foram comparados as TPIV e o número médio de espermatozóides que penetraram oócito (NMEPO) vitrificados em três sistemas de incubação: (a) co-cultivo de oócitos e espermatozóides em placas de petri alocadas em estufa de CO₂ (*ESTUFA*), considerado como controle; (b) sistema submarino (*BAG*), e o (c) co-cultivo de oócitos e espermatozóides em frascos de vidro alocados em um banho-maria (*FRASCO*). No segundo experimento foi verificado se a utilização de oócitos vitrificados pelo sistema OPS ou congelados em CRIOTUBO geram TPIV e NMEPO similares, utilizando diferentes machos.

2 Material e Métodos

Os produtos utilizados nos dois experimentos foram adquiridos da Sigma Chemical Company, (St. Louis, USA), exceto o TCM 199 (Gibco-Invitrogen, Grand Island, N.Y, USA), SFB (Cultilab Mat Cult Cel, Campinas, SP, Brasil), DPBS (Nutricel, Campinas, SP, Brasil) e Supercool™ (21st Century Medicine, Rancho Cucamonga, California, USA).

2.1 Experimento 1:

2.1.1 Obtenção dos oócitos

Os oócitos foram obtidos através da punção de folículos ovarianos entre 3 a 6 mm de diâmetro, oriundos de leitoas pré-púberes (aproximadamente 95 kg), abatidas em frigorífico local e transportados para o laboratório até 60 minutos após o abate das leitoas, em solução salina a 30 °C, acrescida de 40 mg de gentamicina. A punção folicular foi realizada com seringa de 10 mL e agulha de calibre 40 x 12. O material obtido das punções foi colocado em um tubo cônico de 15 mL, e o sedimento formado foi avaliado sob lupa estereomicroscópica, a fim de procurar e selecionar os oócitos. Foram desprezados oócitos que apresentaram partições múltiplas de citoplasma ou lesões de zona pelúcida. Após a seleção, os oócitos sofreram vigorosas e repetidas pipetagens, com auxílio de uma micropipeta dosadora graduada de 200 µL, para a retirada das células do *cumulus oophorus*.

2.1.2 Vitrificação e descongelamento dos oócitos

Nas soluções de vitrificação, foi adicionado 1% de Supercool™, visando reduzir a toxicidade das soluções crioprotetoras e também, por sua capacidade de se ligar e inativar as impurezas que causam a formação de gelo em água ou soluções aquosas (Wowk *et al*, 2000). A solução de vitrificação 1 (VS1) foi composta de 1,4M de DMSO, 1,8M de EG, enquanto que a solução de vitrificação 2 (VS2) foi composta de 2,8M de DMSO, 3,6M de EG, 0,6M de sacarose (Bertholot *et al*, 2000). Grupos de 10 oócitos, previamente selecionados e desnudos, foram passados em 5 gotas de Dulbecco phosphate buffered saline (DPBS) acrescido e 0,4% de albumina sérica bovina (BSA), equilibrados por três minutos na solução VS1 e transferidos para uma microgota de 3-5 µL contendo a solução VS2, onde permaneceram por um minuto e, posteriormente, foram envasados por capilaridade utilizando o método *open pulled straw* (OPS). As palhetas contendo os oócitos foram submetidas ao vapor de nitrogênio por três segundos e então imersas em nitrogênio líquido (Bertholot *et al*, 2000).

O descongelamento foi realizado pela exposição das palhetas ao ar por 5 segundos, e imersão da extremidade que continha os oócitos em solução de 0,5 M de sacarose por 5 minutos (Macedo *et al*, 2006) . A extremidade da palheta oposta aos oócitos foi tampada com o dedo para que se formasse uma pressão positiva e os oócitos fossem expulsos. Na sequência, os oócitos passaram, respectivamente, por gotas de soluções de 0,25 M e 0,125 M de

sacarose e DPBS acrescidas de 0,4% de BSA, permanecendo cinco minutos em cada uma. Tanto as soluções de congelamento quanto às de descongelamento estavam a 39 °C no momento de uso.

2.1.3 Coleta e diluição do sêmen

As amostras de sêmen utilizadas neste experimento foram coletadas de 4 machos, com fertilidade conhecida, alocados em uma central de inseminação artificial de uma unidade produtora de suínos, localizada na região. Após os machos serem coletados pelo método da mão enluvada, o sêmen foi diluído em Beltsville Thawing Solution (BTS - Pursel & Jhonson, 1975) de modo que cada dose possuísse uma concentração de 3×10^9 espermatozóides com motilidade progressiva, em 100 mL, e armazenado a 17 °C até seu uso.

2.1.4 Lavagem espermática

Alíquotas de 12 mL de sêmen diluído, foram centrifugadas por um minuto a uma rotação de 60 gravidades (g). De cada amostra centrifugada, foram recuperados 6 mL do sobrenadante, que foram transferidos para outro tubo cônico, sendo adicionado a este, 6 mL da solução de lavagem (31,8 mg/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 99,7 mg/L de penicilina, 76,7 mg/L sulfato de estreptomicina, 1g/L de albumina sérica bovina) e submetidos a mais três centrifugações de três minutos a uma rotação de 1200 g. Entre estas centrifugações, todo o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* formado foi ressuspenso em 12 mL da solução de lavagem, sendo que após a última centrifugação, o *pellet* formado foi ressuspenso na proporção 1:1 em meio de fecundação (0,91 mM de piruvato de

sódio, 5,5 mM de glicose, 50 µg/mL de penicilina, 75 µg/mL de sulfato de estreptomicina, 1,1 µg/mL de lactato de cálcio), com pH modificado para 7,8 e incubado em estufa com 5% de CO₂, 38,5 °C e ar umidificado, por 40 minutos (adaptado de Funahashi & Day, 1993).

2.1.5 Inseminação dos oócitos

Após descongelamento, os oócitos foram co-incubados com espermatozóides previamente processados (lavados e incubados) a uma concentração de 1×10^6 células móveis/mL, por 18 h.

2.1.6 Sistemas de co-cultivo

Sistema ESTUFA (convencional)

O co-cultivo oócitos/espermatozóides foi realizado em estufa com 5% de CO₂, 38,5 °C e ar umidificado. Neste modelo, 35 oócitos foram colocados em gotas de 300 µL de meio de fecundação (0,91 mM piruvato de sódio; 5,5 mM glucose; 50 µg/mL penicilina; 75 µg/mL sulfato de estreptomicina; 1,1 µg/mL lactato de cálcio e 2 mM cafeína) (conforme utilizado por Macedo *et al* ,2003, 2004, 2006), e alocados em placa de petri de 35 mm de diâmetro e cobertas com 3,5 mL de óleo mineral.

Sistema BAG

Neste sistema, o co-cultivo oócitos/espermatozóides foi realizado conforme descrito por Vajta *et al* (1997b), para produção *in vitro* de embriões

bovino e adaptado por Macedo *et al* (2006), para a realização do teste de penetração espermática *in vitro*. O sistema compreende a utilização de bolsas plásticas (*Bags*), produzidas artesanalmente pelos autores, a partir de bolsas graduadas, utilizadas para diluição de sêmen suíno, com auxílio de seladora plástica, e com volume de aproximadamente 100 cm³. Os *Bags* foram submersos em banho-maria com movimentação contínua da água, mantida a 38,5 °C. Neste modelo, 35 oócitos foram colocados em gotas de 300 µL de meio de fecundação, alocados em placa de petri de 35 mm de diâmetro e cobertas com 3,5 mL de óleo mineral. Para a gaseificação dos *Bags* foi utilizado mistura gasosa disponível comercialmente, composta por 5% de dióxido de carbono, 5% de oxigênio e 90 % de nitrogênio. Os *Bags* foram mantidos submersos a 10 cm da superfície da água, por 18h.

Sistema FRASCO

Neste modelo, 35 oócitos foram colocados em 1000 µL de meio de fecundação, alocado em *FRASCO* de vidro com 32 mm de diâmetro e tampa de borracha, e cobertos com 1,0 mL de óleo mineral. Para o cultivo, os *FRASCOS* foram parcialmente imersos em banho-maria, de forma que somente a porção do *FRASCO* que continha os oócitos, meio de fecundação e o óleo mineral ficasse submerso no banho-maria, e o restante do *FRASCO* acima da superfície da água. Para a gaseificação dos *FRASCOS* foi utilizado a mesma mistura gasosa empregada no sistema *BAG*, composta por 5% de dióxido de carbono, 5% de oxigênio e 90 % de nitrogênio.

2.1.7 Avaliação da TPIV e NMEPO

Ao término do período de 18h de incubação do complexo oócitos/espermatozóides, os mesmos foram transferidos para uma gota de 400µL de DPBS com 0,4% de BSA em placa de quatro poços e sofreram repetidas e vigorosas pipetagens com auxílio de micropipeta dosadora de 100µL, para a retirada dos espermatozóides acessórios. Na seqüência, os oócitos foram passados por gotas de 50µL da mesma solução, onde foram mantidos e então armazenados em geladeira a 5 °C até a avaliação da TPIV, que ocorreu em intervalo de no máximo sete dias.

Para a verificação da TPIV e NMEPO, os oócitos foram expostos a uma solução de Hoescht 33342 (10 µg/mL) em Tissue Culture Medium (TCM), e levados a uma estufa com 38,5 °C, onde permaneceram por 15 minutos (adaptado de Ivanova & Mollova, 1993). Grupos de oito oócitos foram dispostos entre lâmina e lamínula e levados ao microscópio de fluorescência em aumento de 400 x, para a avaliação da TPIV. Foi considerado penetrado, o oócito que apresentou sua zona pelúcida penetrada por pelo menos um espermatozóide, conforme descrito por Ivanova & Mollova (1993).

2.2 Experimento 2

Os oócitos utilizados neste experimento foram obtidos pelo mesmo método do experimento 1.

2.2.1 Congelamento de oócitos em criotubos

A solução utilizada para o congelamento dos oócitos em criotubo foi denominada de solução de congelamento 1 (SC1), composta de 0,7M de DMSO, 0,9 M de EG, acrescida de 1% de Supercool_{TM}. Grupos de trinta e cinco oócitos previamente desnudados foram expostos a uma gota de aproximadamente 7 μ L da solução de congelamento por 120s, e transferidos para criotubos colocados em um suporte de isopor e expostos ao nitrogênio, de forma que somente a metade inferior destes ficasse submersa no nitrogênio. Na sequência foi adicionado ao criotubo, 1 mL da solução de fecundação e 1,2 mL de óleo mineral, sendo o criotubo fechado, retirado do suporte e submerso por completo no nitrogênio.

2.2.2 Vitrificação de oócitos em OPS

A metodologia utilizada para a vitrificação de oócitos em OPS é a mesma descrita no experimento 1.

2.2.3 Descongelamento de oócitos

Para os oócitos congelados em CRIOTUBO, o descongelamento, foi realizado expondo o CRIOTUBO contendo os oócitos, meio de fecundação e óleo mineral, ao banho-maria a 60 °C por 150 segundos.

Para os oócitos congelados no sistema OPS, o descongelamento foi realizado pela exposição das palhetas ao ar por cinco segundos, e imersão da

extremidade que continha os oócitos em solução de 0,5 M de sacarose por cinco minutos. A extremidade da palheta oposta aos oócitos foi tampada com o dedo para que se formasse uma pressão positiva e os oócitos fossem expulsos. Na sequência, os oócitos passaram, respectivamente, por gotas de soluções de 0,25 M e 0,125 M de sacarose e DPBS acrescidas de 0,4% de BSA, permanecendo cinco minutos em cada uma. Tanto as soluções de congelamento quanto às de descongelamento estavam a 39 °C no momento de uso.

2.2.4 Inseminação dos oócitos

Oócitos vitrificados/descongelados pelo método OPS e congelados/descongelados em *CRIOTUBOS*, foram co-incubados com espermatozóides previamente processados (lavados e incubados) a uma concentração de 1×10^6 células móveis/mL, por 18h, conforme descrito no experimento 1. Os machos utilizados nestes experimentos foram os mesmos machos utilizados no experimento 1.

2.2.5 Avaliação da TPIV e NMEPO

O método utilizado para a avaliação da taxa de penetração e do número de espermatozóides por oócito, está descrito anteriormente no experimento 1.

2.2.6 Análise estatística

Nos 2 experimentos o NMEPO foi comparado entre os machos e os tratamentos *ESTUFA*, *BAG* e *FRASCO*, e também entre os tratamentos *CRIOTUBO* e *OPS* através da análise de variância. Em função de não apresentar distribuição normal, esta variável foi submetida à transformação para raiz quadrada. Comparações entre médias foram conduzidas pelo teste LSD.

Os efeitos dos tratamentos e dos diferentes machos sobre a TPIV foram avaliados através de regressão logística. Em ambos os experimentos, em função da ocorrência de interações entre machos e tratamentos, estes eventos individuais foram desconsiderados. Distintas combinações entre machos e tratamentos foram considerados como nível de referência para as comparações estatísticas. Todas as análises estatísticas foram conduzidas com o software Statistix ® (2003).

3 Resultados

Experimento 1

O NMEPO diferiu ($P < 0,05$) entre os três sistemas de incubação avaliados, sendo que o sistema *FRASCO* apresentou o maior NMEPO (Tabela 1).

Tabela 1: Efeito do sistema de incubação sobre o número médio de espermatozóides que penetraram por oócito (NMEPO), considerando todos os machos

Sistema de incubação	Oócitos (n)	NMEPO
<i>ESTUFA</i>	339	6,3 ^b
<i>BAG</i>	276	3,9 ^c
<i>FRASCO</i>	322	15,5 ^a
Total	937	8,57

^{a,b,c} Expoentes distintos indicam significância estatística (P = 0,0006)

A variação no NMEPO foi influenciada por uma interação entre o efeito dos machos utilizados e do sistema de incubação (Tabela 2). No entanto, considerando o resultado obtido nos três tratamentos, o Macho B sempre esteve entre os machos que apresentaram o maior NMEPO (P<0,05), enquanto o Macho C, sempre esteve entre os que obtiveram o menor NMEPO (P<0,05).

Tabela 2: Efeito da interação entre macho e sistema de incubação sobre o número médio de espermatozóides que penetraram por oócito (NMEPO)

Macho	Sistema de incubação						Total
	<i>ESTUFA</i>		<i>BAG</i>		<i>FRASCO</i>		
	NMEPO	n	NMEPO	n	NMEPO	n	
A	6,8 ^{cd}	96	4,2 ^e	59	14,9 ^b	81	8,3 ^B
B	8,7 ^c	61	7,0 ^{cd}	84	26,6 ^a	55	13,1 ^A
C	3,6 ^e	109	0,9 ^f	70	10,2 ^{bc}	74	5,0 ^C
D	6,9 ^{cd}	73	5,0 ^{de}	109	9,8 ^c	66	7,3 ^B

^{a,b,c, d, e, f.} Expoentes distintos indicam significância estatística (P < 0,0001)

^{A, B, C} Expoentes distintos indicam significância estatística (P = 0,0006)

A Tabela 3 apresenta as TPIV alcançadas por cada macho, em cada sistema de incubação, com variação entre 70,8 % e 100%.

Tabela 3: Taxas de penetração *in vitro* por sistema de incubação e por macho

Macho	<i>ESTUFA</i>	<i>BAG</i>	<i>FRASCO</i>	Total
A	70,8	72,9	97,5	80,4
B	100,0	96,4	98,2	98,2
C	93,6	80,0	94,6	89,4
D	98,6	90,8	90,9	93,4
Total	90,8	85,0	95,0	90,4

A avaliação da taxa de penetração de acordo com a interação entre machos e sistemas de incubação mostrada na Tabela 4 considera como níveis de referência o efeito de cada um dos 4 machos dentro do sistema de incubação em *ESTUFA*.

Considerando a combinação entre o Macho A e o sistema de incubação *ESTUFA* como nível de referência (Tabela 4), somente o Macho B no sistema *ESTUFA* e os Machos A e C no sistema *BAG* apresentaram TPIV similares as taxas do nível de referência ($P > 0,05$). Quando o nível de referência foi o Macho B no sistema *ESTUFA*, a TPVI não diferiu em nenhuma das combinações entre machos e tratamentos ($P > 0,05$). Quando o nível de referência foi o Macho C no sistema *ESTUFA*, somente o Macho A alocado no tratamento *ESTUFA* e *BAG* e o Macho C alocado no tratamento *BAG* apresentam TPIV que diferiram do nível de referência ($P < 0,05$). Quando a referência foi o Macho D no sistema *ESTUFA*, somente Macho A nos sistemas *ESTUFA* e *BAG* e o Macho C no sistema *BAG*, apresentaram TPIV que diferem do nível de referência ($P < 0,05$). Desta maneira, quando os machos B, C e D foram alocados no sistema de incubação *FRASCO*, apresentaram TPIV que não diferiram ($P > 0,05$) do nível de referência, quando

este, foi considerado a interação de cada um deles com o sistema *ESTUFA*. Porém, quando os machos foram alocados no sistema de incubação *BAG*, foram os Macho A, B e D que apresentaram TPIV que não diferiram ($P>0,05$) do nível de referência, quando este, foi considerado a interação de cada um deles com o sistema *ESTUFA*.

Tabela 4: Efeito da interação entre macho e tratamento sobre a taxa de penetração *in vitro*, considerando como referência a combinação de diferentes machos com o sistema de incubação em *ESTUFA**

Tratamento	Macho	Tratamento = <i>ESTUFA</i>			
		Macho A	Macho B	Macho C	Macho D
<i>ESTUFA</i>	A	-	0,5269	< 0,0001	0,0010
	B	0,5269	-	0,6335	0,6816
	C	< 0,0001	0,6335	-	0,3712
	D	0,0010	0,6816	0,3712	-
<i>BAG</i>	A	0,7837	0,5313	0,0001	0,0017
	B	0,0001	0,6348	0,9711	0,4002
	C	0,1819	0,5485	0,0014	0,0059
	D	0,0005	0,5887	0,1087	0,0613
<i>FRASCO</i>	A	0,0002	0,6528	0,6419	0,6270
	B	0,0027	0,6679	0,5234	0,8401
	C	0,0004	0,6147	0,5753	0,2109
	D	0,0034	0,5892	0,1470	0,0712

*Números nas celas são valores de P obtidos em modelos de regressão logística

O efeito da interação entre macho e tratamento sobre TPIV, considerando como referência a combinação entre diferentes machos e o sistema de incubação em *BAG*, está descrito na tabela 5. Considerando como nível de referência o Macho A no sistema *BAG*, as únicas TPIV similares ao nível de referência foram observadas para os Machos A e B no sistema *ESTUFA* e para o Macho C no sistema *BAG* ($P>0,05$), sendo que as demais TPIV

diferiram da TPIV observada para o nível de referência ($P < 0,05$). Quando o Macho B no sistema *BAG* foi considerado nível de referência, apenas o Macho A nos sistemas *ESTUFA* e *BAG* e o macho C no sistema *BAG* apresentaram TPIV que diferiram do nível de referência ($P < 0,05$). Quando o nível de referência foi o Macho C no sistema *BAG*, TPIV semelhantes ($P > 0,05$) foram observadas para os Machos A e B no sistema *ESTUFA*, Macho A no sistema *BAG* e Macho D no sistema *FRASCO*, enquanto as demais TPIV foram diferentes da observada para o nível de referência ($P < 0,05$). Considerando o Macho D no sistema *BAG* como referência, as únicas TPIV diferentes foram observadas para o Macho A nos sistemas *BAG* e *ESTUFA* e para o Macho C no sistema *BAG* ($P < 0,05$), no entanto, as demais interações não diferiram ($P > 0,05$) do nível de referência. Desta maneira, quando os machos foram alocados no sistema de incubação *FRASCO*, os Machos B e D apresentaram TPIV que não diferiram ($P > 0,05$) do nível de referência, quando este, foi considerado a interação de cada um deles com o tratamento *BAG*. Porém, quando os machos foram alocados no sistema de incubação *ESTUFA*, foram os Machos A, B e D que apresentaram TPIV que não diferiram ($P > 0,05$) do nível de referência, quando este, foi considerado a interação de cada um deles com o tratamento *BAG*.

Tabela 5: Efeito da interação entre macho e tratamento sobre a taxa de penetração *in vitro*, considerando como referência a combinação de diferentes machos com o sistema de incubação em *BAG**

Tratamento	Macho	Tratamento = <i>BAG</i>			
		Macho A	Macho B	Macho C	Macho D
<i>ESTUFA</i>	A	0,7837	0,0001	0,1819	0,0005
	B	0,5313	0,6348	0,5485	0,5887
	C	0,0001	0,9711	0,0014	0,1087
	D	0,0017	0,4002	0,0059	0,0613
<i>BAG</i>	A	-	0,0004	0,3418	0,0032
	B	0,0004	-	0,0038	0,1372
	C	0,3418	0,0038	-	0,0424
	D	0,0032	0,1372	0,0424	-
<i>FRASCO</i>	A	0,0005	0,6813	0,0032	0,0795
	B	0,0043	0,5529	0,0134	0,1103
	C	0,0015	0,5787	0,0131	0,3518
	D	0,0113	0,1721	0,0793	0,9852

*Números nas celas são valores de P obtidos em modelos de regressão logística

Experimento 2

No experimento 2, o teste de penetração espermática *in vitro* foi realizado utilizando o tratamento *FRASCO*, conforme metodologia descrita no experimento 1. O sistema *FRASCO* foi escolhido pois foi eficiente para determinar diferenças nas TPIV de diferentes machos e por ser de fácil utilização.

A tabela 6 mostra o NMEPO alcançado por cada macho dentro de cada sistema de congelamento avaliado. Agrupando o resultado gerado por todos os machos, o NMEPO no sistema *CRIOTUBO* foi superior ao encontrado no sistema *OPS* ($P < 0,05$). No entanto, ao avaliar isoladamente os resultados obtidos por cada macho, esta superioridade foi característica apenas para o Macho A, que apresentou NMEPO superior ($P < 0,05$), quando os oócitos

utilizados foram congelados no sistema CRIOTUBO do que quando foram vitrificados utilizando o sistema OPS.

Tabela 6: NMEPO em função do sistema de congelamento de oócito e macho utilizado

Macho	Sistema OPS		Sistema <i>CRIOTUBO</i>		Total
	N	NMEPO	N	NMEPO	
A	73	6,2 ^b	59	14,7 ^a	10,5 ^A
B	43	4,0 ^{bc}	39	7,3 ^b	5,6 ^B
C	68	3,9 ^c	86	5,2 ^{bc}	4,5 ^{BC}
D	74	3,1 ^c	88	3,8 ^c	3,5 ^C
Total	258	3,7 ^X	272	7,0 ^Y	

Médias com expoentes distintos diferem por $P < 0,0001$

NMEPO = Número médio de espermatozóides que penetraram por oócito

N= Número de oócito

As TPIV por macho em diferentes sistemas de congelamento variaram entre 70,6% e 94,5%, para o sistema OPS, e entre 89,8% e 100%, para o sistema *CRIOTUBO* (tabela 7).

Tabela 7: Taxas de penetração *in vitro* em função do tratamento e do macho utilizado

Macho	OPS	<i>CRIOTUBO</i>	Total
A	94,5	98,3	96,4
B	76,7	100,0	88,3
C	70,6	95,3	82,9
D	91,9	89,8	90,8
Total	83,4	95,8	89,6

Quando o nível de referência foi o Macho A no sistema OPS, somente os Machos B e C no sistema OPS apresentaram TPIV diferentes da TPIV do nível de referência. Quando o Macho B no sistema OPS foi considerado como referência, as TPIV observadas para o Macho C no sistema OPS e para o

Macho B e D no sistema *CRIOTUBO* foram similares ($P>0,05$), enquanto as demais TPIV foram diferentes ($P<0,05$). Considerando como referência o Macho C no sistema OPS, somente as TPIV para o Macho B nos sistemas OPS e *CRIOTUBO* foram similares ($P>0,05$). Quando o nível de referência foi o Macho D no sistema OPS, somente os Machos B e C alocados no sistema OPS apresentaram TPIV diferente do nível de referência ($P<0,05$). Os Machos A, B e D quando alocados no tratamento *CRIOTUBO*, apresentaram TPIV que não diferiram ($P>0,05$) da TPIV apresentada pelo nível de referência, quando este foi considerado eles mesmos alocados no tratamento OPS (tabela 8).

Tabela 8: Efeito da interação entre macho e tratamento sobre a taxa de penetração *in vitro*, considerando como referência a combinação de diferentes machos com o sistema de congelamento OPS*

Tratamento	Macho	Tratamento = OPS			
		Macho A	Macho B	Macho C	Macho D
OPS	A	-	0,0085	0,0007	0,5293
	B	0,0085	-	0,4777	0,0271
	C	0,0007	0,4777	-	0,0020
	D	0,5293	0,0271	0,0020	-
<i>CRIOTUBO</i>	A	0,2841	0,0075	0,0023	0,1359
	B	0,5630	0,4708	0,4540	0,5387
	C	0,8120	0,0036	0,0002	0,3735
	D	0,2783	0,0523	0,0033	0,6437

*Números nas celas são valores de P obtidos em modelos de regressão logística

4 Discussão

Os resultados obtidos no primeiro experimento demonstram que é possível utilizar sistemas alternativos de co-incubação de gametas no teste de penetração espermática *in vitro*. Neste experimento foram utilizados quatro

machos e, três deles obtiveram TPIV similar ao nível de referência (NR), até mesmo quando a *ESTUFA* foi considerada o NR. Macedo *et al* (2006) demonstram ser possível utilizar o sistema *BAG* para realização do teste de penetração, contudo os autores concluíram que não poderiam ser utilizados oócitos suínos vitrificados neste sistema, pois a maioria dos machos utilizados no experimento apresentaram TPIV menor que o tratamento onde os oócitos eram vitrificados e incubados em estufa. Provavelmente, a diferença existente dos resultados entre os trabalhos deve-se ao fato que no trabalho de Macedo *et al* (2006) a fonte de CO₂ utilizada foi a expiração humana, conforme descrito por (Vajta *et al*, 1997b), enquanto no atual experimento foi utilizada uma mistura gasosa definida (Olivier & Palma, 1998) proporcionando um ambiente similar ao encontrado nas estufas de CO₂. Alterações encontradas por Macedo *et al* (2006) na coloração do meio de fecundação durante o período de incubação, sugerindo alcalinização da solução, não foram evidenciadas no presente experimento.

A utilização do sistema FRASCO não tinha sido relatada até o presente momento, contudo as TPIV obtidos neste sistema foram similares as encontradas nos sistemas *BAG* e *ESTUFA*, na maioria das interações entre macho e tratamentos. O sistema FRASCO foi desenvolvido como uma forma alternativa ao sistema *BAG*, uma vez que é mais fácil e mais seguro para manuseá-lo, além de possuir menor probabilidade de ocorrer trocas gasosas com o ambiente externo, o que ocasiona alteração no pH do meio de fecundação (Macedo *et al*, 2006)

Quando se agrupou o resultado obtido pelos quatro machos utilizados neste experimento, o número médio de espermatozóides que penetraram por oócito (NMEPO) foi maior respectivamente nos sistemas *FRASCO*, *ESTUFA* e *BAG*. O motivo de o tratamento *FRASCO* ter obtido um maior NMEPO deve-se ao fato de neste tratamento a relação número de espermatozóides por oócitos tenha sido maior que a dos tratamentos *BAG* e *ESTUFA*, embora o número de espermatozóides por mL de meio de fecundação tenha sido o mesmo para todos os tratamentos. Embora o NMEPO obtido no tratamento *BAG* tenha sido inferior ao obtido no tratamento *ESTUFA*, pode-se dizer que as alterações realizadas na metodologia utilizada por Macedo *et al* (2006) influenciaram positivamente para aperfeiçoamento do tratamento *BAG* associado a utilização do oócitos vitrificados/descongelados, uma vez que ao avaliar diferentes interações entre machos e tratamentos, observou-se que na maioria das vezes, os resultados obtidos através da interação de determinado macho com o tratamento *ESTUFA* (controle) foi o mesmo resultado obtido pela interação do mesmo macho com o tratamento *BAG*. O mesmo aconteceu com o tratamento *FRASCO*, que na maioria das vezes obteve resultados similares ao controle, além de ter a vantagem de ser de fácil execução.

A utilização de congelamento em *CRIOTUBO* foi testada em função da praticidade que o sistema gera na execução do teste de penetração espermática *in vitro*, uma vez que no mesmo *CRIOTUBO* que os oócitos são congelados, estão presentes, o meio de fertilização e o óleo mineral que são utilizados no período de co-cultivo dos gametas pós descongelamento dos oócitos. Desta

forma é eliminada a necessidade da utilização de lupa para manipulação dos oócitos e toda a preparação do meio de fecundação no dia da realização do teste.

Agrupando o resultado dos quatro machos utilizados no experimento, observou-se que o NMEPO foi significativamente maior no tratamento onde os oócitos foram congelados no sistema *CRIOTUBO* do que no sistema OPS, o que pode estar associado a presença do TCM 199 no ambiente de congelamento e descongelamento do oócito proporcionando uma melhor preservação da estrutura oocitária envolvida no processo de conhecimento e penetração espermática. Segundo Bertholot *et al* (2002), a presença de aminoácidos adicionais no TCM 199 pode aumentar a proteção dos embriões ao congelamento e o sistema tampão Hepes pode também ter um efeito favorável sobre os embriões.

Lynham & Harrison (1998), demonstraram que para executar o teste de penetração espermática *in vitro*, é possível utilizar oócitos suínos criopreservados em uma simples solução de soro fetal bovino (SFB) e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO). A solução de congelamento de oócitos utilizada no experimento 2, foi constituída com a metade da concentração da solução de equilíbrio (VS1), utilizada no experimento 1. Em protocolos de vitrificação de embriões e oócitos, soluções como esta, são utilizadas para fazer uma prévia desidratação celular, evitando danos celulares devido a choque osmótico causado pela solução de vitrificação, geralmente denominada VS2 ou VS3 (Mahmoudzadeh *et al*, 1995; Saalfeld *et al*, 1997). No presente trabalho, esta

solução foi utilizada como única solução de congelamento, mesmo sabendo que em vários experimentos (Vajta *et al*, 1997ab, Vajta *et al*, 1998ab, Isachenko *et al*, 1998; Vajta *et al* 1999; Macedo *et al*, 2004) foram utilizados concentrações maiores dos crioprotetores, objetivando preservar a integridade e funcionalidade das estruturas oocitárias. No entanto, a hipótese era que a solução utilizada no presente trabalho fosse capaz de preservar as estruturas oocitárias envolvidas no processo de fertilização, e também possibilitasse o descongelamento direto, sem fazer re-hidratação oocitária em etapas, exigido quando se utiliza concentração maiores de crioprotetores. Desta forma, eliminou-se a necessidade de micromanipular os oócitos, durante e pós descongelamento, pois eles foram descongelados diretamente no meio de fecundação. Para manter os oócitos, solução de congelamento, solução de descongelamento e meio de fecundação no mesmo recipiente, foi necessário que os oócitos após serem exposto a solução de congelamento, fossem alocados no *CRIOTUBO* (tubo criogênico) e estes parcialmente imersos no N₂L por no mínimo 45s, dificultando possíveis diluições da solução de congelamento, causada pelo meio de fecundação que foi disposto logo acima. Ainda objetivando preservação da concentração inicial da solução de congelamento, o meio de fecundação foi colocado no tubo criogênico com auxílio de uma micropipeta graduada de 1000µL, de forma que o meio fosse orientado para escorrer pela parede interna do tubo, que estava resfriada, pelo contato direto com o N₂L. Assim, o meio de fecundação congelou quase que instantaneamente, evitando trocas com a solução de congelamento.

A utilização do *CRIOTUBO* para congelamento de oócitos não tem sido relatada na literatura, contudo Chian *et al* (2004) utilizaram os *CRIOTUBOS* para armazenar oócitos bovinos previamente vitrificados em finas palhetas e obtiveram altas taxas de sobrevivência. A utilização de *CRIOTUBO* para conter os oócitos durante o congelamento não tem sido utilizada, provavelmente porque ele possui uma parede mais espessa que as palhetas de 0,25 mL que geralmente são utilizadas, diminuindo a velocidade de congelamento e a viabilidade celular (Vajta *et al*, 1998). Contudo, no presente experimento a utilização do *CRIOTUBO* foi capaz de preservar as estruturas de interesse no teste de penetração espermática além de simplificar o processo de descongelamento e preparação da placa de co-incubação oócito-espermatozóide.

5 Conclusões

No experimento 1, embora tenha ficado evidente a existência da interação entre macho e tratamento, na maioria das vezes o resultado da interação dos diferentes machos com o tratamento *FRASCO* ou *BAG* não diferiu do resultado obtido da interação dos mesmos machos com o tratamento *ESTUFA* (controle), quando este foi considerado nível de referência, demonstrando que ambos os sistemas podem ser utilizados no teste de penetração espermática *in vitro*.

No experimento 2, o tratamento *CRIOTUBO* mostrou-se uma excelente ferramenta para facilitar a execução do teste de penetração espermática *in vitro*, uma vez que é capaz de preservar o oócito durante o processo de congelamento/descongelamento e elimina a necessidade do uso de lupa para manipulação do oócito pós descongelamento.

6 Referência Bibliográfica

BARTH, A.D.,1992. The relationship between sperm abnormalities and fertility.

In: Proc. 14th Tech. Conf. Artif. Insem. Reprod,1992, Milwaukee. Anais...

Milwaukee, WI: Natl. Assoc. Anim. Breeders.74-63.

BERTHOLOT, F., BOTTÉ-MARTINAT, F.A., LOCATELLI, A., PERREAU, C., TERQUI, M., 2000. Piglets born after vitrification of embryos using the open pulled straw method. *Cryobiology* 41, 116-124.

BERTHOLOT, F., BOTTÉ-MARTINAT, F.A., PERREAU, C., LOCATELLI, A., MANCEAU, P., VENTURI, E., TERQUI, M., 2002. The use of an appropriate vitrification medium allows development of 30% of cryopreserved blastocyst and their as live piglets. *Pig news and information*, 23, 103-108.

CHIAN, R. C., KUWAYAMA, M., LEONARD, T., JUSTIN, T., KATO, O., NAGAI, T., 2004. High survival rate of bovine oocytes matured in vitro following vitrification. *Journal of Reproduction and Development* 50, 685-696.

- DESCHAMPS, J.C., LUCIA, T. JR., TALAMINI, D.J.D. , 1998. A cadeia produtiva da suinocultura. In: CALDAS, R.A., PINHEIRO, L.E.L., MEDEIROS, J.X., MIZUTA, H., GAMA, G.B.M.N., CUNHA, P.R.D.Z., KUABARA, M.Y., BLUMENSHEIN, A. Agronegócio Brasileiro – Ciência, Tecnologia e Competitividade. CNPq, Brasília-DF. 239-255.
- FUNAHASHI, H., DAY, B., 1993. Effects of the duration of exposure to supplemental hormones on cytoplasmic maturation of pig oocytes *in vitro*. Journal of Reproduction and Fertility, 98, 179-85.
- FUNAHASHI, H., DAY, B.N., 2003. Effects of the duration of exposure to supplemental hormones on cytoplasmic maturation of pig oocytes *in vitro*. J. Reprod. Fert. 98, 179-185.
- GADEA, J., MATÁS, C., LUCAS, X., 1998. Prediction of porcine semen fertility by homologous *in vitro* penetration (hIVP) assay. Animal Reproduction science 56, 95-108.
- GADEA, J., SELLS`S, E., MARCO, M. A., 2004. The predictive value of porcine seminal parameters on fertility outcome under commercial conditions. Reproduction Domestic Animal 39, 303-308.
- ISACHENKO, V., SOLER, C., ISACHENKO, E., 1998. Vitrification of Immature Porcine Oocytes: Effects of Lipid Droplets, Temperature, Cytoskeleton, and Addition and Removal of Cryoprotectant. Cryobiology 36, 250–253.
- IVANOVA, M., MOLLOVA, M., 1993. Zona-penetration *in vitro* test for evaluating boar sperm fertility. Theriogenology 40, 397-410.

- LINFORD, E., GLOVER, F.A., BISHOP, C., STEWARD, D.L., 1976. The relationship between semen evaluation methods and fertility in the bull. *Journal of Reproduction and Fertility* 147, 283-291.
- LYNHAM, J.A., HARRISON, R.A.P., 1998. Use of stored pig eggs to assess boar sperm fertilizing functions *in vitro*. *Biology of Reproduction* 58, 539-550.
- MACEDO, JR. M. C., DESCHAMPS, J.C., LUCIA, JR. T., BORDIGNON, J., SERRET, C.G., RAMBO, G., COLLARES, T., BECKER, G.K., 2003. Penetração espermática *in vitro* na espécie suína utilizando oócitos homólogos vitrificados. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 27, 383-384.
- MACEDO JR, M.C., DESCHAMPS, J.C., LUCIA JR, T., BORDIGNON, J., SERRET, C.G., RAMBO, G., PIVATO, I., SCHMITT,E., COLLARES, T. 2004. *In vitro* penetration of fresh and vitrified swine oocytes by homologous spermatozoa in different incubation systems. XV International Congress on Animal Reproduction. Abstract, v.2, p. 426 Brazil, Porto Seguro –BA.
- MACEDO JR, M.C., DESCHAMPS, J.C., LUCIA JR, T., BORDIGNON, J., SERRET, C., RAMBO, G., PIVATO, I., SCHMITT, E., 2006. *In vitro* penetration of fresh and vitrified swine oocytes by homologous spermatozoa using different incubation systems. *Animal Reproduction Science* 92, 334-348.

- MAHMOUDZADEH, A.R., VAN SOOM, A., BOLS, P., YSEBAERT, M.T., KRUIF, A., 1995. Optimization of a simple vitrification procedure for bovine embryos produced *in vitro*: effect of developmental stage, two-step addition of cryoprotectant and sucrose dilution on embryonic survival. *Journal of Reproduction and Fertility* 103, 33-39.
- MARTÍNEZ, E., VÁZQUEZ, J. M., MATAS, C., ROCA, J., COY, P., GADEA, J., 1993. Evaluation of boar spermatozoa penetrating capacity using pig oocytes at the germinal vesicle stage. *Theriogenology* 40, 547-557.
- OLIVIER, N. S., PALMA, G. A, ALBERIO, R., 1998. *In vitro* production of bovine embryos in water bath. In: *Proceedings International Embryo Transfer Society Congress*. *Theriogenology*, 49, 211.
- PURSEL, V.G., JONSON, L.A. , 1975. Freezing of boar spermatozoa: Freezing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *Journal of Animal Science* 40, 99-102.
- SAAFELD, M.H., RUMPF, R., DESCHAMPS, J.C., PEGORARO, L.M.C. , 1997. Vitrificação de ovócitos imaturos de bovinos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 21, 75-78.
- SÁNCHEZ-RUIZ, A.L., O'DONOGHUE., NOVAK, S., DYCK, M.K., COSGROVE, JR. DIXON, W. T.; FOXCROFT, G. R. , 2006. The predicative value of routine semen evaluation and IVF technology for determining relative boar fertility. *Theriogenology* 66, 736-748.
- STATISTIX® user's manual. 2003. Analytical software. Tallahassee, FL.

- VAJTA, G., BOOTH, P.J., HOLM, P., GREVE, T., CALLESEN, H., 1997a. Successful vitrification of early stage bovine *in vitro* produced embryos with the open pulled straw (OPS) method. Cryo-Letters 18, 191-195.
- VAJTA, G., HOLM, P., GREVE, T., CALLESEN, H., 1997b. The submarine incubation system, a new tool for *in vitro* embryo culture: a technique report. Theriogenology 48, 1379-1385.
- VAJTA, G., HOLM, P., GREVE, T., CALLESEN, H., 1997c. Vitrification of porcine embryos using the open pulled straw (OPS) method. Acta. Vet. Scand. 38, 349-352.
- VAJTA, G., HOLM, P., KUWAYAMA, M., BOOTH, P.J.; JACOBSEM, H., GREVE, T., CALLESEN, H., 1998a. Successful vitrification of early stage bovine *in vitro* produced embryos with the open pulled straw (OPS) method. Molecular Reproduction and Development 51, 53-58.
- VAJTA, G., LEWIS, I.M., KUWAYAMA, M., GREVE, T., CALLESEN, H. 1998b. Sterile application of the open pulled straw (OPS) vitrification method. Cryo-Letters 19, 389-392.
- WOWK, B., LEITI, E., RASCH, C. M., KARIMI, N. B., HARRIS, S. B.; GREFOR, M.F., 2000. Vitrification enhancement by synthetic ice blocking agents. Cryobiology 40, 228-236.
- XU, X., POMMIER, S., ARBOV, T., HUTCHINGS, B., SOTTI, W., FOXCROFT, G.R., 1998. *In vitro* maturation and fertilization techniques for assessment of semen quality and boar fertility. Journal of Animal Science 76, 3079-3089.

Artigo 2 - Teste de penetração espermática *in vitro* e fertilidade *in vivo* na espécie suína após inseminação heterospérmica e identificação genética da paternidade

M. C Macedo Jr., T. Lucia Jr., E. B. Ferreira Filho, G. Rambo, A. Rosa, C. Fabiane, A. Menin, J. C. Deschamps

Centro de Biotecnologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas

96010-900 Pelotas-RS, Brasil

(Artigo escrito segundo as normas da revista Animal Reproduction Science)

Resumo

O presente trabalho é composto por dois experimentos, nos quais quatro machos foram utilizados em cada experimento e 3074 oócitos foram avaliados. O primeiro experimento avaliou o efeito da combinação de três concentrações espermáticas ($0,5 \times 10^6$, 1×10^6 e 2×10^6 espermatozóides por mL de meio de fecundação) e três períodos de incubação (6, 12 e 18h) totalizando 9 tratamentos (T). O T1, T2 e T3 foram compostos respectivamente por $0,5 \times 10^6$ espermatozóides por mL e 6, 12 e 18h de incubação. O T4, T5 e T6 (controle)

foram compostos, respectivamente, por 1×10^6 espermatozóides por mL e 6, 12 e 18h de incubação e o T7, T8 e T9 foram compostos respectivamente, por 2×10^6 espermatozóides por mL e 6, 12 e 18h de incubação. O número médio de espermatozóide que penetraram por oócito (NMEPO) variou entre 1,7 e 13,2, enquanto que a taxa de penetração espermática *in vivo* (TPIV) variou de 30,9% a 98,3%. O teste LSD identificou diferença estatística ($P < 0,05$) entre tratamentos, porém, o NMEPO não diferiu entre os T5, T6, T7 e T8, para os quatro machos utilizados. A análise de regressão logística identificou que nenhum dos oito tratamentos apresentou TPIV similar ($P > 0,05$) ao T6, para todos os machos, entretanto o T7 e T9 apresentaram TPIV similar ($P > 0,05$) ao T6 para três dos quatro machos utilizados. O segundo experimento avaliou se o macho com maior capacidade fecundante *in vitro* é o mesmo que produz mais leitões *in vivo*, sendo que o T7 do experimento um foi escolhido para ser utilizado no experimento 2. O NMEPO foi de 0,82, 0,80, 2,44 e 3,45 respectivamente para os Machos A, B, C e D, enquanto a TPIV foi de 52,5%, 53,2%, 76,4% e 91,3%, respectivamente, para os mesmos machos. Através da regressão logística demonstrou-se que com exceção dos machos A e B, todos os demais machos apresentaram TPIV diferentes ($P < 0,05$) entre si. As estimativas da fertilidade *in vivo* foram geradas após a inseminação artificial de 34 fêmeas suínas, utilizando um *pool* de sêmen dos mesmos machos e das mesmas amostras utilizadas no teste de penetração espermática *in vitro* e a avaliação da paternidade dos leitões nascidos utilizando microssatélites marcadores. Das 34 fêmeas inseminadas, nasceram 442 leitões sendo que

destes apenas 209 (47,3%) tiveram paternidade identificada. Os machos A, B, C e D foram identificados como progenitores de 22%, 29,2%, 25,8%, e 23% dos leitões nascidos, respectivamente, porém, o teste de qui-quadrado não identificou diferenças ($P>0,05$) entre as porcentagens de participação de cada macho na paternidade dos leitões. A utilização de 2×10^6 espermatozóides por mL de meio de fecundação no teste de penetração espermática *in vitro* possibilita reduzir o tempo de co-incubação de oócitos e espermatozóides para 6h, porém a diferença encontrada na capacidade fertilizante *in vitro* de diferentes machos não foi evidenciada *in vivo*.

Palavras chaves: Teste de penetração espermática *in vitro*, diagnóstico de paternidade, suínos.

1 Introdução

Muitos trabalhos têm sido realizados buscando associar características espermáticas, testes laboratoriais e fertilidade *in vivo*, pois a capacidade fertilizante de um reprodutor é de grande impacto econômico, principalmente em programas de inseminação artificial (IA). Métodos laboratoriais têm sido desenhados para testar diferentes aspectos da qualidade seminal e alguns dos quais têm sido correlacionados com fertilidade (Larsson & Rodriguez-Martinez, 2000).

Entre os testes que objetivam predizer *in vitro* a fertilidade *in vivo*, a produção *in vitro* de embriões, teste de penetração espermática *in vitro*, ligação a zona pelúcida e teste da hemizona tem sido utilizado com êxito em espécies de aptidão produtiva (Berger, 1989; Cox *et al* 1994; Fukui *et al*, 1998; Ward *et al*,

2003; Braundmeier *et al*, 2004; Sánchez-Ruiz *et al*, 2006) e animais de companhia e esporte (Meyers *et al.*, 1996; Holst *et al*, 2000a; Holst *et al* 2000b; Hermansson *et al*, 2006;). Estes testes têm a capacidade avaliar todas as etapas da fertilização (Martinez 1993) e mimetizar *in vitro* os processos que acontecem *in vivo*. Contudo a complexidade para a execução do teste, a necessidade de técnicos treinados, grande demanda de tempo e equipamentos de custos elevados limitam a utilização deste tipo de análise.

Com o objetivo de simplificar o teste, Macedo *et al* (2006), demonstraram ser possível utilizar separadamente oócitos vitrificados e o sistema de incubação submarino (Vajta *et al*, 1997) na execução do teste de penetração espermática *in vitro*, eliminando o custo da estufa de CO₂ ou viabilizando a formação de um banco do oócitos possibilitando que o teste seja realizado até mesmo em locais que não exista abatedouro próximo. Este processo também foi utilizado por Macedo (2007), que também apresentou a utilização de oócitos criopreservados em criotubos, juntamente com óleo mineral e meio de fecundação no teste de penetração espermática *in vitro*.

No entanto, o teste de penetração espermática *in vitro* ainda necessita ser validado, sendo necessário verificar se as modificações propostas na metodologia do teste irão preservar a associação dos resultados obtidos *in vitro* e fertilidade *in vivo*.

O primeiro experimento teve o objetivo de comparar 3 períodos de co-incubação oócitos/espermatozóides (6, 12 e 18h) com 3 concentrações (0,5 x

10^6 , 1×10^6 e $2,0 \times 10^6$) espermáticas sobre a taxa de penetração espermática *in vitro* (TPIV) e o número médio de espermatozóide que penetram por oócito (NMEPO). O tratamento do experimento 1 que apresentou resultados similares ao tratamento controle, porém com um período de incubação menor que 18h, foi eleito para ser utilizado no segundo experimento. O segundo experimento teve como objetivo verificar a associação entre os resultados obtidos pelo teste de penetração espermática *in vitro* e a taxa de paternidade *in vivo* de leitões, após inseminação artificial de fêmeas suínas utilizando um *pool* de sêmen de quatro machos, com posterior identificação da paternidade de leitões através da amplificação de regiões microssatélites polimórficas, pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) (Nechtelberger *et al*, 2001).

2 Material e Métodos

Os produtos utilizados nos dois experimentos foram adquiridos da Sigma Chemical Company, (St. Louis, USA), exceto o TCM 199 (Gibco-Invitrogen, Grand Island, N.Y, USA), SFB (Cultilab Mat Cult Cel, Campinas, SP, Brasil), DPBS (Nutricel, Campinas, SP, Brasil) e Supercool_{TM} (21st Century Medicine, Rancho Cucamonga, California, USA).

2.1 Experimento 1

2.1.1 Obtenção dos oócitos

Os oócitos foram obtidos através da punção de folículos ovarianos entre 3 a 6 mm de diâmetro, oriundos de leitoas pré-púberes (aproximadamente 95

kg), abatidas em frigorífico local e transportados para o laboratório até 60 minutos após o abate das leitoas, em solução salina a 30 °C, acrescida de 40 mg de gentamicina. A punção folicular foi realizada com seringa de 10 mL e agulha de calibre 40 x 12. O material obtido das punções foi colocado em um tubo cônico de 15 mL, e o sedimento formado foi avaliado sob lupa estereomicroscópica, a fim de procurar e selecionar os oócitos. Foram desprezados os oócitos que apresentaram partições múltiplas de citoplasma ou lesões de zona pelúcida. Após a seleção, os oócitos sofreram vigorosas e repetidas pipetagens, com auxílio de uma micropipeta dosadora graduada de 200 µL, para a retirada das células do *cumulus oophorus* (Macedo *et al* 2006).

2.1.2 Congelamento e descongelamento de oócitos em CRIOTUBOS

A solução utilizada para o congelamento dos oócitos em criotubo foi denominada de solução de congelamento 1 (SC1), composta de 0,7 M de DMSO, 0,9 M de EG, acrescida de 1% de Supercool_{TM}. Trinta e cinco oócitos previamente desnudados foram expostos a uma gota de aproximadamente 7 µL da solução de congelamento por 120 segundos, e transferidos para um criotubo, que foi colocado em um suporte de isopor e exposto ao nitrogênio, de forma que somente a metade inferior do criotubo ficasse submersa no nitrogênio. Na seqüência, foi adicionado ao criotubo, 1 mL da solução de fecundação e 1,2 mL de óleo mineral, sendo o criotubo fechado, retirado do suporte e submerso por completo no nitrogênio. Para o descongelamento, o criotubo contendo os

oócitos, meio de fecundação e óleo mineral, foram expostos ao banho-maria a 60 °C por 150 segundos.

2.1.3 Coleta e diluição do sêmen

As amostras de sêmen utilizadas neste experimento foram coletadas de 4 machos, com fertilidade conhecida, alocados em uma central de inseminação artificial de uma unidade produtora de suínos, localizada na região. Após os machos serem coletados pelo método da mão enluvada, o sêmen foi diluído em Beltsville Thawing Solution (BTS - Pursel & Jhonson, 1975) de modo que cada dose possuísse uma concentração de 3×10^9 espermatozóides com motilidade progressiva, em 100 mL, e armazenado a 17 °C até seu uso.

2.1.4 Lavagem espermática

Alíquotas de 12 mL de sêmen diluído foram centrifugadas por um minuto a uma rotação de 60 gravidades (g). De cada amostra centrifugada, foram recuperados 6 mL do sobrenadante, que foram transferidos para outro tubo cônico, sendo adicionado a este, 6 mL da solução de lavagem (31,8 mg/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 99,7 mg/L de penicilina, 76,7 mg/L sulfato de estreptomicina, 1g/L de albumina sérica bovina) e submetidos a mais três centrifugações de três minutos a uma rotação de 1200 g. Entre estas centrifugações, todo o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* formado foi ressuspenso em 12 mL da solução de lavagem, sendo que após a última centrifugação, o *pellet* formado foi ressuspenso na proporção 1:1 em meio de fecundação (0,91 mM de piruvato de

sódio, 5,5 mM de glicose, 50 µg/mL de penicilina, 75 µg/mL de sulfato de estreptomicina, 1,1 µg/mL de lactato de cálcio), com pH modificado para 7,8 e incubado em estufa com 5% de CO₂, 38,5 °C e ar umidificado, por 40 minutos (adaptado de Funahashi & Day, 1993).

2.1.5 Inseminação dos oócitos

Oócitos congelados/descongelados foram co-incubados com espermatozóides previamente processados (lavados e incubados) a uma concentração de 1×10^6 células móveis/mL, por 18h.

2.1.6 Sistema de cultivo FRASCO

Neste modelo, 35 oócitos foram colocados em 1000 µL de meio de fecundação, alocado em frascos de vidro com 32 mm de diâmetro e tampa de borracha, e cobertos com 1,0 mL de óleo mineral. Para o cultivo, os frascos foram parcialmente imersos em banho-maria, de forma que somente a porção do frascos que continha os oócitos, meio de fecundação e o óleo mineral ficassem submersos no banho-maria, e o restante do frascos mantido acima da superfície da água. Para a gaseificação dos frascos foi utilizado a mesma mistura gasosa empregada no sistema *BAG* por Vajta *et al* (1997), composta por 5% de dióxido de carbono, 5% de oxigênio e 90 % de nitrogênio.

2.1.7 Avaliação da taxa de penetração

Ao término do período de incubação do complexo oócitos/espermatozóides, os mesmos foram transferidos para uma gota de 400 μL de DPBS com 0,4% de BSA em placa de quatro poços e sofreram repetidas e vigorosas pipetagens com auxílio de micropipeta dosadora de 100 μL , para a retirada dos espermatozóides acessórios. Na seqüência, os oócitos foram passados por gotas de 50 μL da mesma solução, onde foram mantidos e então armazenados em geladeira a 5 $^{\circ}\text{C}$ até a avaliação da taxa de penetração, que ocorreu em intervalo de no máximo sete dias.

Para a verificação da taxa de penetração, os oócitos foram expostos a uma solução de Hoescht 33342 (10 $\mu\text{g/mL}$) em Tissue Culture Medium (TCM), e levados a uma estufa com 38,5 $^{\circ}\text{C}$, onde permaneceram por 15 minutos (adaptado de Ivanova & Mollova, 1993). Grupos de oito oócitos foram dispostos entre lâmina e lamínula e levados ao microscópio de fluorescência em aumento de 400 x, para a verificação da porcentagem de oócitos penetrados bem como o número de espermatozóides por oócito. Foi considerado penetrado aquele oócito que apresentou sua zona pelúcida penetrada por pelo menos um espermatozóide, conforme descrito por Ivanova & Mollova (1993).

2.2 Experimento 2

No experimento 2 o processo de execução do teste de penetração espermática *in vitro* foi realizado utilizando a metodologia empregada no tratamento 7 do experimento 1.

2.2.1 Preparação das doses inseminantes e inseminação artificial de fêmeas suínas

Foram utilizadas 34 fêmeas suínas F1 (Large White x Landrace) alocadas em uma granja comercial localizada na região de Pelotas. Durante o cio, as fêmeas foram inseminadas três vezes. Nas duas primeiras IA, a dose inseminante continha de $2,8 \times 10^9$ espermatozóides com motilidade em um volume de 100 mL, no momento da preparação e, a última inseminação foi realizada com a metade da concentração e do volume das duas primeiras, conforme manejo da granja.

O sêmen utilizado na IA foi proveniente do mesmo ejaculado utilizado para o teste de penetração espermática *in vitro* (TPIV), porém após a coleta, o ejaculado de cada macho foi diluído em Beltsville Thawing Solution (BTS - Pursel e Johnson, 1975) na proporção 1:1 (ejaculado:diluyente) e mantido em banho-maria até que todos os machos fossem coletados. Uma amostra de cada ejaculado coletado foi diluída em BTS para formar doses com $2,8 \times 10^9$ espermatozóide em 100 mL e estas amostras foram utilizadas no teste de penetração espermática *in vitro*. Outra amostra de cada ejaculado foi utilizada na formação de um *pool* de sêmen, contendo $0,7 \times 10^9$ espermatozóides móveis de cada macho, totalizando $2,8 \times 10^9$ espermatozóides em volume ajustado com

BTS para 100 mL, que foi utilizada na inseminação artificial. Foi utilizada inseminação heterospérmica com o objetivo de estabelecer as mesmas condições para o sêmen de todos os machos, eliminando a possibilidade do sêmen dos diferentes machos receberem tratamentos diferentes, além de igualar, para todos os machos, individualidades referentes às fêmeas e ou habilidade do inseminador.

A inseminação artificial (IA) foi realizada de acordo com o intervalo desmame cio (IDC). Para fêmeas com IDC curto, a primeira IA foi realizada 24h após a observação do cio, a segunda IA foi realizada 12h após a primeira e a terceira 12h após a segunda. Para fêmeas com IDC médio, a primeira IA foi realizada 12h após a observação do cio, a segunda IA foi realizada 12h após a primeira e a terceira IA foi 12h após a segunda. Para fêmeas com IDC longo, a primeira IA foi realizada logo após a observação do cio, a segunda IA foi realizada 12h após a primeira, e a terceira IA foi 12h após a segunda, caso a fêmea ainda estivesse em cio.

2.2.2 Genotipagem dos pais e dos leitões, utilizando microssatélite marcadores

Extração de DNA

Ao nascimento dos leitões provenientes da inseminação heterospérmica, foi coletado uma amostra da cauda de cada indivíduo nascido para posterior genotipagem. Após a retirada da cauda, a mesma foi imersa em álcool 70 % e

armazenadas individualmente a 5 °C até o momento da extração do ácido desoxiribonucleico (DNA). A extração de DNA do tecido da cauda foi realizada conforme descrito por Cesconeto (2003) e adaptada de Sambrook *et al* (2002).

A extração de DNA dos reprodutores utilizados no experimento foi realizada a partir de amostra de sangue utilizando o Kit Puregene (2000). Foram coletados de cada reprodutor, 5 mL de sangue, que foram acondicionados em Vacutainer contendo etileno diamino tetraacético (EDTA) e congelados até o momento da extração do DNA.

Marcadores moleculares

Para identificar a paternidade dos leitões, inicialmente utilizou-se 5 pares de *primers* denominados de TNFm1, TNFm2, IGF-I, S0082, S0097 (Joahansson *et al* 1992; Ellegren *et al* 1993 e Looft *et al*, 1995), utilizado para este fim por Stahlberg *et al* (2000) e Cesconeto (2003). Contudo os dados obtidos não foram conclusivos pois os *primers* TNFm1 e IGF-I não produziram amplificações e as amplificações geradas pelos demais *primers* não foram suficientemente polimórficas para identificar a paternidade dos leitões. Nesta primeira tentativa de identificação da paternidade, a corrida eletroforética foi realizada em gel poliacrilamida e coloração por impregnação de prata.

Na seqüência foram utilizados 10 pares de marcadores microsatélites, conforme descrito por Nechtelberger *et al* (2001). Os marcadores moleculares utilizados foram S005, S0090, S0101, S0155, S0355, S0386, SW24, SW240, SW857 e SW951. O *primer forward* de cada um dos microsatélites foi marcado

com um, de três tipos de sondas fluorescentes, possibilitando que fragmentos amplificados por diferentes *primers*, porém com o mesmo tamanho, pudessem ser identificados.

Na sequência foi realizada a genotipagem do produto da PCR utilizando os *primers* descritos na tabela 1.

Tabela 1: Características dos *primers* utilizados nas PCR

Locus	Marcador	NM	Primers	Pb
S0005	FAM	500	F: 5'-TCC TTC CCT CCT GGT AAC TA-3' R: 5'-GCA CTT CCT GAT TCT GGG TA-3'	203-243
S0090	TET	500	F: 5'-CCA AGA CTG CCT TGT AGG TGA ATA-3' R: 5'-GCT ATC AAG TAT TGT ACC ATT AGG-3'	240-253
S0101	TET	80	F: 5'-GAA TGC AAA GAG TTC AGT GTA GG-3' R: 5'-GTC TCC CTC ACA CTT ACC GCA G-3'	196-224
S0155	FAM	150	F: 5'-TGT TCT CTG TTT CTC CTC TGT TTG-3' R: 5'-GTT AAA GTG GAA AGA GTC AAT GGC TAT-3' ^b	148-164
S0355	HEX	200	F: 5'-TCT GGC TCC TAC ACT CCT TCT TGA TG-3' R: 5'-GTT TGG GTG GGT GCT GAA AAA TAG GA-3' ^b	245-271
S0386	HEX	500	F: 5'-GAA CTC CTG GGT CTT ATT TTC TA -3' ^b R: 5'-GTC AAA AAT CTT TTT ATC TCC AAC AGT AT-3' ^b	158-174
SW24	FAM	300	F: 5'-CTT TGG GTG GAG TGT GTG C-3' R: 5'-ATC CAA ATG CTG CAA GCG-3'	92-112
SW240	TET	150	F: 5'-AGA AAT TAG TGC CTC AAA TTG G-3' R: 5'-AAA CCA TTA AGT CCC TAG CAA A-3'	93-114
SW857	TET	100	F: 5'-TGA GAG GTC AGT TAC AGA AGA CC-3' R: 5'-GAT CCT CCT CCA AAT CCC AT-3'	145-159
SW951	HEX	150	F: 5'-TTT CAC AAC TCT GGC ACC AG-3' R: 5'-GAT CGT GCC CAA ATG GAC-3'	121-136

F= Forward

R= Reverse

b= Sequencia modificada

Pb = Pares de base

NM= Quantidade de *primer* utilizado em nanomolar

Amplificação de fragmento de DNA pela técnica da PCR

Foram realizadas reações da PCR multiplex (10 pares de *primers*) em um termociclador Eppendorff®. Cada reação foi realizada em volume total de 15 µL, contendo 200 µM de cada dNTP, 2,5 mM MgCl₂, 1,25 Taq polimerase, 1 X PCR buffer e DNA. A quantidade de cada *primer* que foi utilizado na reação e esta descrito na tabela 1. A condição da PCR incluiu desnaturação inicial de 10 minutos a 95 °C, 27 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60 °C, 90 segundos a 72 °C e extensão final de 30 minutos a 72 °C. Os fragmentos da PCR foram analisados em um seqüenciador automático modelo ABI3100 (Applied Biosystems 3100), e software Gene Mapper versão 3.5.

2.8 Análise estatística

O número médio de espermatozóides que penetraram por oócito foi comparado entre os machos por análise de variância. Em função de não apresentar distribuição normal, esta variável foi submetida à transformação para raiz quadrada. Comparações entre médias foram conduzidas pelo teste LSD. Os efeitos dos tratamentos e dos diferentes machos sobre a taxa de penetração espermática *in vitro* foram avaliados através de regressão logística e pelo teste de Qui-quadrado. Distintas combinações entre machos e tratamentos foram considerados como nível de referência para as comparações estatísticas. Todas as análises estatísticas foram conduzidas com o software Statistix ® (2003).

3. Resultados

Experimento 1

A Tabela 2 apresenta o efeito da interação entre macho e tratamento sobre a taxa de penetração *in vitro*, considerando como referência a combinação de diferentes machos com o T6, sendo que as comparações foram feitas apenas dentro de cada macho. Ao analisar as TPIV obtidas pelo Macho A, somente os tratamentos T1 e T7 apresentaram taxas de penetração *in vitro* diferentes ($P < 0,05$) do T6. Ao analisar as TPIV obtidas pelo macho B, somente o tratamento T3 apresentou TPIV diferente ($P < 0,05$) do nível de referência. Ao analisar as TPIV obtidas pelo macho C, somente os tratamentos T1, T2, T3, T4 e T5 apresentaram TPIV diferentes ($P < 0,05$) do nível de referência. As TPIV obtidas pelo macho D, somente os tratamentos T2, T4, T5, e T8 foram diferentes ($P < 0,05$) do nível de referência.

Embora vários tratamentos tenham apresentado resultados similares ao nível de referência, dentro de cada macho, não foi identificado um tratamento que apresentasse resultado similar ao nível de referência para todos os machos, contudo, o tratamento 7 foi o único tratamento com período de incubação de 6h, no qual três dos quatro machos testados, apresentaram resultados que não diferiram ($P > 0,05$) do nível de referência.

Tabela 2: TPIV em modelos de regressão logística para diferentes concentrações espermática e tempo de co-incubação de gametas obtidos por diferentes machos

T	Concentração	Incubação (h)	Macho A			Macho B			Macho C			Macho D		
			N	TPIV	P	N	TPIV	P	N	TPIV	P	N	TPIV	P
1	0,5 x 10 ⁶	6	51	64,7	0,0388	55	41,8	0,1478	68	30,9	0,0000	48	62,5	0,2180
2		12	75	88,0	0,4662	87	69,0	0,1290	64	59,4	0,0229	80	43,8	0,0005
3		18	60	90,0	0,3100	148	78,4	0,0026	63	60,3	0,0314	70	68,6	0,5357
4	1 x 10 ⁶	6	63	90,5	0,2669	49	63,3	0,4618	47	53,2	0,0057	114	57,0	0,0309
5		12	63	90,5	0,2669	54	55,6	0,9636	55	60,0	0,0346	138	44,9	0,0002
6		18	48	83,3	NR	50	56,0	NR	90	76,7	NR	64	73,4	NR
7	2 x 10 ⁹	6	60	98,3	0,0207	64	41,2	0,1841	72	83,3	0,2969	95	68,4	0,4967
8		12	53	96,2	0,0464	82	54,9	0,8999	59	88,1	0,0842	113	37,2	0,0001
9		18	84	94,0	0,0461	93	55,9	0,9921	78	75,6	0,8762	76	80,3	0,3187
Totais			557			682			596			798		

TPIV = Taxa de penetração espermática

NR= Nível de referência

P= Nível de significância

N= Número de oócitos

Concentração = Concentração espermática

T= Tratamento

Para todos os machos utilizados, o número médio de espermatozóide penetrado por oócitos obtido nos tratamentos 5, 7 e 8 não diferiu ($P>0,05$) do tratamento 6, considerado o tratamento controle (Tabela 3).

Tabela 3: Número médio de espermatozóide que penetram por oócitos para diferentes machos e tratamentos

T	CE X 10 ⁶	TI	MACHO A	MACHO B	MACHO C	MACHO D
1	0,5	6	4,7 ^{de}	1,7 ^d	3,7 ^b	3,5 ^e
2	0,5	12	4,7 ^{de}	4,7 ^c	3,7 ^b	3,8 ^e
3	0,5	18	7,6 ^{cd}	5,2 ^{bc}	5,2 ^b	5,0 ^{de}
4	1	6	9,1 ^{bc}	6,3 ^{abc}	5,1 ^b	4,8 ^{de}
5	1	12	11,0 ^{ab}	8,1 ^{ab}	7,6 ^a	6,2 ^{cd}
6	1	18	11,7 ^{ab}	8,1 ^{ab}	7,4 ^a	8,3 ^{bc}
7	2	6	11,7 ^{ab}	8,1 ^{ab}	8,1 ^a	8,3 ^{bc}
8	2	12	12,9 ^a	8,0 ^{ab}	8,2 ^a	8,4 ^b
9	2	18	13,1 ^a	8,3 ^a	8,8 ^a	13,2 ^a

Frequências com expoentes distintos na mesma coluna diferem por pelo menos $P<0,05$ de acordo com o teste Qui-Quadrado.

T= Tratamento

CE= Concentração espermática

TI= Tempo de incubação

Experimento 2

Foram utilizadas 34 fêmeas suínas, as quais geraram 442 leitões, sendo que 209 leitões tiveram paternidade identificada (tabela 4).

Tabela 4: Estatística descritiva do diagnóstico de paternidade

Paternidade	Número de leitões
Com paternidade identificada	209
Sem paternidade identificada	233
Total de leitões avaliados	442

Do total de 209 leitões com paternidade identificada 46 eram filhos do Macho A, 61 leitões eram filhos do macho B, 54 leitões eram filhos do macho C e 48 filhos eram filhos do macho D. Foi atribuída aos machos A, B, C e D a participação na paternidade dos leitões na ordem de 22%, 29,2%, 25,8% e 23% respectivamente (tabela 5).

Tabela 5: Identificação de paternidade obtida pelos diferentes machos

Macho	Nº leitões identificação de paternidade (%)	% de Identificação de Paternidade
A	46 (22,0)	10,4
B	61 (29,2)	13,8
C	54 (25,8)	12,2
D	48 (23,0)	10,8
Total	209	47,3

Frequências não diferiram $P < 0,05$

O NMEPO e a TPIV variou em função dos machos utilizados. Os Machos A, B, C e D obtiveram NMEPO de 0,82, 0,80, 2,44, e 3,45, respectivamente, e taxa de penetração de 52,5%, 53,2%, 76,4% e 91,3%, respectivamente (tabela 6).

No modelo de regressão logística quando Macho A foi considerado o nível de referência, somente o macho B apresentou taxa de penetração *in vitro* similar ($P > 0,05$) ao nível de referência. Quando o macho C foi considerado o nível de referência, todos os demais machos apresentaram taxas de penetração

diferentes, sendo que os Machos A e B apresentaram taxas de penetração inferiores ($P < 0,05$) e o macho D apresentou taxa de penetração superior ao nível de referência (tabela 6).

Tabela 6: Taxa de penetração *in vitro* e número médio de espermatozóides que penetraram por oócitos obtido por diferentes machos

Macho	Nº de oócitos	NMEPO	TPIV
A	101	0,82	52,5 ^a
B	109	0,80	53,2 ^a
C	127	2,44	76,4 ^b
D	104	3,45	91,3 ^c

^{abc} Taxas comparadas através de regressão logística diferem por pelo menos $P < 0,01$

4. Discussão

Diferentes períodos de co-incubação de espermatozóides e oócitos durante o processo de produção *in vitro* de embriões suínos têm sido testados (Coy *et al*, 1993; Gil *et al* 2004), contudo o mesmo não tem acontecido no teste de penetração espermática *in vitro*.

No primeiro experimento deste trabalho, foi verificado o efeito da combinação de diferentes períodos de incubação e concentração espermática sobre o número médio de espermatozóide que penetram por oócito (NMEPO) e a taxa de penetração espermática *in vitro* (TPIV) e, verificou-se que estes índices variaram em função do tempo de co-incubação dos gametas, da concentração espermática utilizada e do macho doador de sêmen. Os machos C e D apresentaram NMEPO que não diferiram estatisticamente nos tratamentos

T1, T2, T3 e T4, sendo que no tratamento T3 a concentração espermática foi a mesma do tratamento T1, porém o período de incubação foi 12 h adicionais. O mesmo não aconteceu com o Macho B, que apresentou NMEPO diferente entre os tratamentos T1 e T2, onde a concentração espermática foi a mesma e o período de incubação tinha apenas 6h de diferença, indicando que alguns machos expressam todo o seu potencial de fertilização nas primeiras horas de co-incubação com os oócitos, enquanto outros, necessitam de mais tempo. Até o presente momento não há relatos de trabalhos que realizaram o teste de penetração espermática *in vitro* em períodos reduzidos de incubação (menos que 18h) e verificaram a associação com capacidade fertilizante *in vivo* na espécie suína, embora Coy *et al* (1993) descreveram que a TPIV foi de 93,9% quando o período de incubação foi de 8h. No entanto, no experimento 1 do presente trabalho, todos os machos utilizados apresentaram o mesmo NMEPO no tratamento T7 (concentração $2 \times 10^6/\text{mL}$ e 6h de co-incubação) e no tratamento T6 (controle, com 18h de co-incubação e concentração espermática de $1 \times 10^6/\text{mL}$). Quando a TPIV foi avaliada, somente o Macho A alocado no tratamento T7 apresentou TPVI diferente do tratamento T6, porém, o mesmo não aconteceu com os demais machos, indicando que é possível reduzir o período de co-incubação de espermatozóide e oócitos em até 12h, se a concentração espermática utilizada for de $2 \times 10^6/\text{mL}$, apresentando os mesmos resultados obtidos pelo controle. Gil *et al* (2004) observaram em seu trabalho que não houve alteração na TPIV em um intervalo de co-incubação que variou de 10min a 6h. Porém, o mesmo não aconteceu com o NMEPO que,

curiosamente, foi maior quando o período de co-incubação foi de 10 ou 30 min do que quando foi de 6h. No presente experimento, isto não aconteceu e, na maioria das vezes o NMEPO foi maior nos períodos de co-incubação mais longos, embora nem sempre esta diferença foi estatisticamente comprovada. Estes resultados justificam o fato de muitos protocolos de produção *in vitro* de embriões suínos utilizarem períodos de co-incubação de oócito e espermatozóide que não exceda 6h , já que quanto menor for este período, menor é a taxa de fecundação polispérmica (Gil *et al*, 2004). No primeiro experimento, embora as TPIV tenham sido comparadas apenas com o nível de referência, foi possível observar que, numericamente, nem sempre a TPIV foi proporcional a concentração espermática e o tempo de co-incubação dos gametas. Isto provavelmente tenha acontecido em função da interação entre machos e tratamentos ou por dificuldade de padronização dos oócitos utilizados, fazendo com que o mesmo interfira nos resultados obtidos, já que oócitos oriundos de diferentes grupos interagem diferentemente com os espermatozoides (Braunmeier & Miller, 2001; Hermansson *et al*, 2006). Desta forma, quanto maior for a padronização dos oócitos utilizados, menor será sua influência nos resultados obtidos. No entanto, a padronização é deficiente e de difícil realização, em função das dificuldades de avaliar todas as estruturas do oócito que interferem na capacidade do espermatozóide em penetra-los, além de existirem predadores moleculares que mensuram o potencial do oócito em ser fertilizado (Wang e Sun, 2007) e que jamais foram avaliados para este fim, pois inviabilizariam a realização do teste. Aspectos morfológicos e celulares como a

presença das células do *cumulus oophorus* (Matas *et al*, 1996; Campos *et al* 2001), tamanho do oócito (Matas *et al*, 1996; Lucas *et al*, 2003) e estágio de maturação oocitária (Martinez *et al*, 1993; Coy *et al*, 1999) são características comumente avaliadas que interferem na penetração espermática *in vitro* e que colaboram para selecionar oócitos com menor variabilidade entre si. Contudo, tais características não são suficientes para impedir que diferentes oócitos interfiram desigualmente nos resultados. Estes achados não diminuem a importância do teste de penetração espermática *in vitro*, já que existem trabalhos mostrando a sua associação com fertilidade *in vivo* (Berger *et al* 1996; Gadea *et al*, 1998), porém, ajudam a elucidar dificuldades encontradas para repetir alguns resultados.

Ao identificar a paternidade dos leitões que nasceram do experimento, verificou-se que não houve diferença estatística na porcentagem de leitões que foram gerados pelos quatro machos utilizados. Provavelmente a concentração espermática na dose inseminante foi alta o suficiente para mascarar diferenças na fertilidade dos machos utilizados, porém não foi possível utilizar doses inseminantes menos concentradas, pois o experimento foi realizado em uma granja comercial e não se poderia colocar em risco os índices de produtividade da unidade. Uma segunda hipótese é que o sêmen utilizado 24, 48 ou até 72h após coleta e diluição teve sua capacidade fertilizante diminuída, e que o sêmen dos machos categorizados como de maiores fertilidade *in vitro*, até 12h após coleta, teve sua capacidade fertilizante alterada, modificando o ranqueamento dos machos quanto a capacidade fertilizante *in vitro*, durante o período de

armazenagem, conforme mostraram Macedo *et al* (2006). A terceira hipótese é que os leitões que não tiveram a paternidade identificada pudessem revelar possíveis diferenças na fertilidade *in vivo*.

Nechtelberger *et al.*, (2001) obtiveram sucesso na identificação da paternidade utilizando os mesmos *primers* que foram utilizados neste experimento. Entretanto, no presente experimento houve dificuldade em determinar a paternidade em aproximadamente em 50% das amostras e, o mesmo aconteceu com Panzardi (2006) utilizando alguns desses *primers*. Embora o diagnóstico de paternidade tenha sido utilizado com êxito em experimentos anteriores (Vicente *et al*, 2004; Stahlberg *et al*, 2000) como ferramenta de diagnóstico para mensurar a fertilidade *in vivo*, alguns autores encontraram baixa taxa de exclusão utilizando inclusive *primers* recomendado pelo ISAG (International Society for Animal Genetics) (Ron *et al*, 1995; Panzardi, 2006).

Em função das dificuldades encontradas para diagnóstico da paternidade no presente experimento e nos experimentos acima citados, ao selecionar os reprodutores a serem utilizados em experimentos futuros, deve ser levado em consideração o grau de polimorfismo das regiões a serem amplificadas em cada reprodutor. Neste experimento, a baixa taxa de exclusão ou a não identificação de paternidade pode estar relacionada ao grau de parentesco entre os animais utilizados. É uma prática na unidade de produção de suínos onde foi realizado o experimento, utilizar reprodutores nascidos e

selecionados na própria granja, ocasionando consangüinidade e consequentemente, diminuindo o grau de polimorfismo das regiões amplificadas.

5. Conclusões

É possível diminuir o período de incubação de espermatozóides e oócitos no teste de penetração espermática *in vitro* de 18 para 6h desde que a concentração espermática seja de $2 \times 10^6/\text{mL}$. A diferença existente na capacidade fertilizante *in vitro* entre os machos testados, não foi verificada *in vivo*, onde todos os machos apresentaram a mesma taxa de paternidade. A utilização do processo aqui descrito, associando o uso do congelamento de oócitos em criotubos e diminuição de 12h no período de realização do teste é um avanço que colabora para que no futuro, este teste possa ser utilizado em granjas comerciais e, não apenas em ambientes de pesquisa.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERGER, T., ANDERSON, J.L., PENEDO, M.C.T., 1996. Porcine sperm fertilizing potential in relationship to sperm functional capacities. *Animal Reproduction Science* 44, 231-239.
- BERGER, T., 1989. Development of a zona-free hamster ova bioassay for goat sperm. *Theriogenology* 32, 69–77.
- BRAUNDMEIER, A.G., DEMERS, J.M., SHANKS, R.D., MILLER, D.J., 2004. The relationship of porcine sperm zona-binding ability to fertility. *Journal of Animal Science* 82, 452-458.
- BRAUNDMEIER, A., MILLER, D.J., 2001. The search on: Finding accurate molecular makers of male fertility. *Journal of Dairy Science* 84, 1915-1925.
- CAMPOS, I., COY, P., ROMAR, R., RUIZ, S., GADEA, J., 2001. Effects of maturational stage, *cumulus oophorus* cells and coincubation of mature and immature *cumulus oophorus*-oocyte complexes on *in vitro* penetrability of porcine oocytes. *Theriogenology* 55, 1489-1500.
- CESCONETO, R.J. Identificação de paternidade para a avaliação da contribuição da primeira e segunda dose inseminante na composição da leitegada suína. 2003. Dissertação (Mestre em Manejo Reprodutivo Animal). Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- COY, P., MARTINEZ, E., RUIZ, S., VAZQUEZ, J M., ROCA, J., MATAS, C. 1993. Sperm concentration influences fertilization and male pronuclear formation *in vitro* in pigs. *Theriogenology* 40, 539-546.

- COY, P., RUIZ, R., ROMAR, R., CAMPOS, I., GADEA, J., 1999. Maturation, fertilization and complete development of porcine oocytes matured under different systems. *Theriogenology* 51, 799-812.
- COX, J. F., AVILA, J., SARAIVA, F., SANTA MARIA, A., 1994. Assessment of fertilizing ability of goat spermatozoa by *in vitro* fertilization of cattle and sheep intact oocytes. *Theriogenology* 41, 1621–1629.
- ELLEGREN, H., JOHANSON, M., CHOWDHARY, B.P., MARKLUND, S., RUYTER, D., MARKLUND, L., BRAUNER-NIELSEN, P., EDFORDS-LILJA, I., GUSTAVSSON, I., JUNEJA, R.K., ANDERSON, L., 1993. Assignment of 20 microsatellite markers to the porcine linkage map. *Genomics* 16, 431-439.
- FUKUI, Y., GLEW, A.M., GANDOLFI, F., MOOR, R.M., 1988. Ram-specific effects on in-vitro fertilization and cleavage of sheep oocytes matured *in vitro*. *Journal of reproduction and Fertility*. 82, 337–340.
- FUNAHASHI, H., DAY, B., 1993. Effects of the duration of exposure to supplemental hormones on cytoplasmic maturation of pig oocytes in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*, 98, 179-85.
- GADEA, J., MATÁS, C., LUCAS, X., 1998. Prediction of porcine semen fertility by homologous *in vitro* penetration (hIVP) assay. *Animal Reproduction Science* 56, 95-108.
- GIL, M.A., JUAN, M.R., VAZQUEZ, J.M., ROCA, J., DAY, B.N., MARTINEZ, E.A., 2004. Effect of short periods of sperm-oocyte co incubation during in

- vitro fertilization on embryo development in pigs. *Theriogenology* 62, 544-552.
- HERMANSSON, U., PONGLOWHAPAN, S., FORSBERG, C.L., HOLST, B.S.A., 2006. short sperm-oocyte incubation time ZBA in the dog. *Theriogenology* 66, 717-725.
- HOLST, B.S., LARSSON, B., LINDE-FORSBERG, C., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H., 2000b. Sperm binding capacity and ultrastructure of the zona pellucida of stored canine oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility* 119, 77-83.
- HOLST, B.S., LARSSON, B., LINDE-FORSBERG, C., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H., 2000a. Evaluation of chilled and frozen-thawed canine spermatozoa using a zona pellucida binding assay. *Journal of Reproduction and Fertility* 119, 201-206.
- IVANOVA, M., MOLLOVA, M., 1993. Zona-penetration *in vitro* test for evaluating boar sperm fertility. *Theriogenology* 40, 397-410.
- JOHANSSON, M., ELLEGREN, H., ANDERSSON, L., 1992. Cloning and characterization Highly polymorphic porcine microsatellites. *Journal Heredity* 83, 196-198.
- LARSSON, B., RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H., 2000. Can we use *in vitro* fertilization tests to predict semen fertility. *Animal Reproduction Science* 327-336.
- LOOFT, C., NAGEL, M., CHARDON, P., NUNES, M., VAIMAN, M., KALM, E., 1995. Dinucleotide repeat polymorphism at the porcine *tnf* locus. *Animal Genetics* 26, 366-367.

- LUCAS, C., MARTÍNEZ, E.A., ROCA, J., VÁQUEZ, J.M., GIL, M.A., PASTOR, L.M.; ALABART, J.L., 2003. Influence of follicle size on the penetrability of immature pig oocytes for homologous in vitro penetration assay. *Theriogenology* 60, 659-667.
- MACEDO JR, M.C. Avaliação de sistema de criopreservação de oócitos e co-incubação de gametas no teste de penetração espermática *in vitro*. Tese (Doutorado em Ciências), trabalho 1. Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Agrícola, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2007.
- MACEDO JR, M.C., DESCHAMPS, J.C., LUCIA, T. JR., BORDIGNON, J., SERRET, C., RAMBO, G., PIVATO, I., SCHMITT, E., 2006. *In vitro* penetration of fresh and vitrified swine oocytes by homologous spermatozoa using different incubation systems. *Animal Reproduction Science* 92, 334-348.
- MARTÍNEZ, E., VÁZQUEZ, J.M., MATAS, C., ROCA, J., COY, P., GADEA, J., 1993. Evaluation of boar spermatozoa penetrating capacity using pig oocytes at the germinal vesicle stage. *Theriogenology* 40, 547-557.
- MATAS, C., MARTINEZ, E., VAZQUEZ, J.M., ROTA, J., GADEA, J., 1996. *In vitro* penetration assay of boar sperm fertility: Effect of various factors on the penetrability of immature pig oocytes. *Theriogenology* 46, 503-513.
- MEYERS, S.A., LIU, I.K.M., OVERSTREET, J.W., VADAS, S., DROBINS, E.Z., 1996. Zona pellucida binding and zona-induced acrosome in horse spermatozoa: comparison between fertile and subfertile stallions. *Theriogenology* 46, 1277-1288.

- NECHTELBERGER, D., KALTWASSER, C., STUR, I., MEYER, J. N., BREN, G., MÜLLER, M., MÜLLER, S.Ü., 2001. DNA Microsatellite analysis for parentage control in Austrian pigs. *Animal Biotechnology* 12, 141-144.
- PANZARDI, A. Determinação da paternidade de leitegadas suínas por marcadores microssatélites utilizando inseminação heterospérmica, com deposição espermática intracervical e intrauterina, para a verificação da contribuição individual de machos suínos. Dissertação (Mestre em Área de concentração: Reprodução Animal). Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas 2006.
- PUREGENE™. 2000. Genomic DNA kit isolation. Gentra systems, Inc, p.15-16.
- PURSEL, V.G., JOHNSON, L.A., 1975. Freezing of boar spermatozoa: Freezing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J. Anim. Sci.* 40, 99-102.
- RON, M., BLANC, Y., BAND, M., EZRA, E., WELLER, J.I., 1995. Misidentification rate in the Israeli Dairy Cattle Population and its implication for Genetic Improvement. *Journal of Dairy Science* 79, 676-681.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MARTINS, T. *Molecular Cloning, Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, 2002.
- SÁNCHEZ-RUIZ, A.L., O'DONOGHUE, R., NOVAK, S., DYCK, M.K., COSGROVE, J.R., DIXON, W.T., FOXCROFT, G.R., 2006. The predicative value of routine semen evaluation and IVF technology for determining relative boar fertility. *Theriogenology* 66, 736-748.

- STAHLBERG, R., HARLIZIUS, B., WEITZE, K. F., WABERSKI, D., 2000. Identification of embryo paternity using polymorphic DNA markers to assess fertilizing capacity of spermatozoa after heterospermic insemination in boars. *Theriogenology* 53, 1365-1373.
- STATISTIX® user's manual. 2003. Analytical software. Tallahassee, FL.
- VAJTA, G., HOLM, P., GREVE, T., CALLESEN, H., 1997. The submarine incubation system, a new tool for *in vitro* embryo culture: a technique report. *Theriogenology* 48, 1379-1385.
- VICENTE, J.S., CASTRO, M.P.V., LAVARA, R., MOCÉ, E., 2004. Study of fertilising capacity of spermatozoa after heterospermic insemination in rabbit using DNA markers. *Theriogenology* 61, 1357-1365.
- WANG, W, SUN, Q-Y., 2007. Evaluation of oocytes quality: morphological, cellular and molecular predictors. *Reproduction, Fertility and Development* 19, 1-12.
- WARD, F., RIZOS, D., BOLAND, M., LONERGAN, P., 2003. Effect of reducing sperm concentration during IVF on the ability to distinguish between bulls of high and low field fertility: work in progress. *Theriogenology* 59, 1575-1584.
- XU, X., POMMIER, S., ARBOV, T., HUTCHINGS, B., SOTTI, W., FOXCROFT, G.R., 1998. *In vitro* maturation and fertilization techniques for assessment of semen quality and boar fertility. *Journal of Animal Science* 76, 3079-3089.

Conclusões Gerais

Embora tenha ficado evidente a existência da interação entre macho e tratamento, na maioria das vezes o resultado obtido da interação dos diferentes machos com o tratamento *FRASCO* ou *BAG* não diferiu do resultado obtido da interação dos mesmos machos com o tratamento *ESTUFA* (controle), quando este foi considerado nível de referência, demonstrando que ambos os sistemas podem ser utilizados no teste de penetração espermática *in vitro*.

O tratamento *CRIOTUBO* mostrou-se uma excelente ferramenta para facilitar a execução do teste de penetração espermática *in vitro*, uma vez que é capaz de preservar o oócito durante o processo de congelamento/descongelamento e elimina a necessidade do uso de lupa para manipulação do oócito pós descongelamento.

É possível diminuir o período de incubação de espermatozóides e oócitos no teste de penetração espermática *in vitro* de 18 para 6h desde que a concentração espermática seja de $2 \times 10^6/\text{mL}$. A diferença existente na capacidade fertilizante *in vitro* entre os machos testados, não foi verificada *in*

vivo, onde todos os machos apresentaram a mesma capacidade de produzir leitões.

A utilização do processo aqui descrito, associando o uso de congelamento de oócitos em *CRIOTUBO* e diminuição de 12h no período de realização do teste é um avanço que colabora para que no futuro, este teste possa ser utilizado em granjas comerciais e, não apenas em ambientes de pesquisa.