

## **DETERMINAÇÃO DE PATERNIDADE EM INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL INTRACERVICAL E INTRA-UTERINA COM DOSES HETEROSPÉRMICAS**

**CORCINI, Carine Dahl<sup>1</sup>; PANZARDI, Andrea<sup>1</sup>; PIASSI, Lígia Maria<sup>1</sup>; MADEIRA, Elisângela Mirapalheta<sup>1</sup>; BRESSEL, Roberta Mattos Collares<sup>2</sup>; PINTO, Luciano da Silva<sup>2</sup>; DESCHAMPS, João Carlos<sup>1</sup>; LUCIA JR., Thomaz<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>PIGPEL – Núcleo de ensino, pesquisa e serviços em reprodução e produção de suínos, Faculdade de Veterinária <sup>2</sup>Laboratório de biologia celular e molecular, Centro de Biotecnologia. UFPEL, Campus Universitário – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900. [ccorcini.fv@ufpel.edu.br](mailto:ccorcini.fv@ufpel.edu.br)

### **1. INTRODUÇÃO**

Novos métodos de inseminação artificial (IA) tem sido utilizados de forma crescente na espécie suína. Na IA convencional (intracervical), o sêmen é depositado no interior da cérvix (Corrêa et al., 2001). Na IA intra-uterina, o sêmen é depositado no corpo do útero através de um cateter específico (Watson & Behan 2002). Estudos comparando as técnicas intracervical (IAIC) e intra-uterina (IAIU) demonstraram semelhantes taxas de parição e número total de leitões nascidos (Watson & Behan, 2002; Mezalira et al., 2003, Serret et al., 2005). Assim, a IAIU possibilitaria uma redução no volume e na concentração da dose inseminante, o que maximiza o potencial de machos doadores de sêmen com alto mérito genético, pois estes serão usados na IA de um maior número de matrizes.

No entanto, mesmo que diferentes reprodutores tenham sido avaliados de forma semelhante através de métodos de determinação de qualidade de sêmen, diferenças individuais entre os machos podem ser responsáveis por diferenças em seu desempenho reprodutivo (Vesseur et al., 1996; Popwell & Flowers, 2004). Segundo Dziuk (1996), o uso de IA heterospérmica, com doses contendo sêmen de mais um de macho, poderiam minimizar essas diferenças. Portanto, com a IAIU potencializando o uso de poucos reprodutores para um grande número de fêmeas, métodos cada vez mais eficazes se tornam necessários para diferenciar o desempenho reprodutivo individual. Este trabalho comparou as técnicas de IAIC e IAIU, ambas com uso de doses heterospérmicas, em condições de rotina de granja, com posterior determinação genética da paternidade atribuída a cada macho na formação das leitegadas.

### **2. MATERIAL E MÉTODOS**

Foram utilizadas 25 fêmeas da linhagem Naïma, genética Penarlan<sup>®</sup>, de ordem de parto (OP) 2-5, pertencentes a um plantel comercial. Estas fêmeas foram inseminadas com doses heterospérmicas, foram 6 *pools* contendo ejaculados de dois machos (34 – 48; 44 – 92; 34 – 41; 38 – 41; 38 – 92; 46 – 92). Dentre estas fêmeas, 10 receberam inseminação artificial intracervical (IAIC) e 15 receberam inseminação artificial intra-uterina (IAIU). Informações referentes ao total de leitões nascidos por parto foram registradas.

De cada um dos 5 reprodutores utilizados como doadores de sêmen, foram coletadas amostras de 10 ml de sangue, por punção da veia jugular, utilizando-se 2 tubos vacutainer de 5 ml, contendo EDTA potássico (50 µl -K<sub>3</sub> a 15%), para prevenir a coagulação do sangue. O sangue foi acondicionado à 5 °C. Após o nascimento das leitegadas, foram coletadas as caudas dos leitões nascidos (n = 300), através da amputação de 2/3 da mesma com alicate elétrico. As caudas foram imediatamente acondicionadas em álcool 70%, identificadas e armazenadas em refrigerador doméstico (5 °C). Um dos machos (nº. 38) morreu antes que fosse possível a coleta de material para a análise.

A extração do DNA do sangue dos machos foi realizada por um protocolo proposto por Regitano (2001). A extração do DNA das caudas dos leitões foi realizada a partir do protocolo proposto por Black et al. (1997) e Doyle & Doyle (1987). Depois de extraídas, as amostras de DNA, que foram armazenadas a -20 °C. Foram utilizados 9 marcadores microssatélites (SW24, SW951, SW857, SO386, SO101, SO090, SW240, SO155, SO355), indicados pela *International Society for Animal Genetics (ISAG)*, descritos por Nechtelberger et al. (2001) e Putnova et al. (2003). O *primer Forward* de cada marcador foi conjugado a sondas fluorescentes, de acordo com o tamanho de seu fragmento, para possibilitar a genotipagem do produto da PCR. Para a PCR foram formados dois *multiplex*, distribuídos de acordo com o tamanho dos fragmentos esperados. As PCR foram realizadas segundo o protocolo modificado de Nechtelberger et al. (2001), com volume final de 25 µl de reação: 200 µM dNTPs, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,8 µl de cada *primer*, 1,25 U Taq DNA polimerase (Invitrogen®), 1 x PCR *buffer* e 20 - 100 ng de DNA genômico. As PCR foram amplificadas em termociclador Eppendorff®, num programa utilizado por Nechtelberger et al. (2001). A análise do produto da PCR foi realizada por genotipagem, no seqüenciador automático ABI 377 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Perkin-Elmer), utilizando-se o software *Gene Scan*®. Os resultados obtidos foram analisados através da porcentagem de exclusão de paternidade, em relação às fêmeas, e em relação às respectivas leitegadas nas quais foi realizada a extração do DNA.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Mesmo utilizando marcadores recomendados pelo ISAG, tidos como os ideais para a determinação de parentesco em suínos (Nechtelberger et al., 2001; Putnova et al., 2003), estes apresentaram baixo grau de polimorfismo, possivelmente em virtude dos animais utilizados serem da mesma genética (granja comercial), ou ainda pelo fato desta genética não ser a ideal para a utilização destes marcadores (Ron et al., 1995). Somente 7 dos 9 marcadores microssatélites utilizados no experimento, contribuíram na determinação da paternidade (SW951, SW857, SO386, SO101, SW240, SO155, SO355). O marcador SO090 não produziu amplificação alguma na região alvo do genoma, possivelmente por erro no momento de sua síntese, tanto em relação à adição, ou deleção de um nucleotídeo, impedindo a amplificação do fragmento de DNA referente a este *loco*. Já o SW24 apresentou-se monomórfico, podendo esta ocorrência ser atribuída à presença de um gene em pressão de seleção, devido a processos de melhoramento genético nesta população.

Todas as 25 leitegadas analisadas apresentaram alguns leitões dos quais não foi possível excluir a paternidade. Dos 300 leitões genotipados, foi possível excluir a paternidade em 94 (33%). Além disso, das 25 leitegadas, 3 (12%) apresentaram leitões cuja paternidade poderia ser atribuída aos 2 reprodutores incluídos no pool

do sêmen em questão. Das 25 leitegadas genotipadas, 10 foram originárias da IAIC (129 leitões) e 15 da IAIU (171 leitões). A média de leitões nascidos nas leitegadas genotipadas foi de 12,0; sendo de 12,9 para a IAIC e de 11,4 para a IAIU os resultados semelhantes encontrados por Serret et al. (2005)

A exclusão de paternidade entre os reprodutores, com exceção no macho 38, é mostrada na Tabela 1. Esta exclusão foi semelhante entre as técnicas de IA para a maioria dos machos, com exceção do macho 92, para o qual a maioria dos leitões com exclusão de paternidade foram originários da IAIC. No pool 4 (com o maior número de amostras), o macho 44 apresentou maior contribuição para a formação das leitegadas do que o macho 92. O mesmo poder ser dito para a comparação entre o mesmo macho 92 e o macho 46, no pool 5. Assim, o macho 92 aparentemente apresenta baixo desempenho reprodutivo tanto na IAIC, quanto na IAIU, mas este efeito individual ficaria mascarado com o uso de IA heterospérmica. Entretanto, esta hipótese não pôde ser totalmente comprovada, em função do baixo polimorfismo dos marcadores utilizados, o qual também não permitiu a identificação de diferenças no desempenho dos reprodutores, em função das técnicas de IA utilizadas.

**Tabela 1.** Exclusão de paternidade por reprodutor e por método de inseminação artificial.

Reprodutor	Leitões genotipados	Método de Inseminação artificial.	
		IAIC	IAIU
34	12	5	7
38	0	0	0
41	14	9	5
44	46	20	26
46	13	6	7
92	13	8	1

#### 4. CONCLUSÕES

Não foi possível obter resultados concretos em termos de desempenho reprodutivo dos machos em relação às técnicas de IA utilizadas, devido ao baixo grau de exclusão da paternidade. Novos trabalhos deverão ser realizados, em genéticas distintas, para verificar se a falha na determinação da paternidade se deu em virtude do baixo potencial polimórfico dos marcadores utilizados, devido ao alto grau de parentesco, ocorrência de mutações, ou devido à genética utilizada não ser a ideal para a utilização destes *loci*.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CORRÊA, M N; MEINCKE, W; LUCIA, T. Jr.; DESCHAMPS, J C. Inseminação artificial em suínos. Curitiba - PR: PRINTPAR Gráfica e Editora Ltda., 2001. v. 1. 181  
 WATSON, P; F.; BEHAN, J. R. Intrauterine insemination of sows with reduced sperm numbers: results of a commercially based field trial. **Theriogenology**. v. 57, p. 1683-1693. 2002.

MEZALIRA, A.; DALLANORA, D; SCHMIDT, A.C.T. et al. Desempenho reprodutivo de fêmeas suínas de acordo com o macho utilizado na inseminação intra-uterina. In: XI Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos. **Anais**. 2003.

SERRET, C.G; ALVARENGA, M.V.F; CORIA, A.L.P. *et al.* Intrauterine artificial insemination of swine with different sperm concentrations, parities, and methods for prediction of ovulation. **Animal Reproduction**, v. 2, p. 205-256, 2005.

VESSEUR, P.C.; KEMP, B.; HARTOG, L.A. Factors influencing the proportion of offspring from second insemination in sows. **Animal Reproduction Science**. v. 41, p. 255-265, 1996.

POPWELL, 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. 97-113, 2004.

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.

REGITANO, L.C.A. Extração de DNA para Aplicação em Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). In: REGITANO, L.C.A.; COUTINHO, L.L. **Biologia molecular aplicada à produção animal**, p. 179-194, 2001.

BLACK, W.C; KLOMPEN, J.S.H.; KEIRANS, J.E. Phylogenetic Relationships among Tick Subfamilies (Ixodida: Ixodidae: Argasidae) Based on the 18S Nuclear rDNA gene. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v. 7; p. 120 -144, 1997.

DOYLE, J. J.: DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**. v. 19; p. 11-15. 1987.

NECHTELBERGER, D.; KALTWASSER, C.; MEYER, S. *et.al.* DNA Microsatellite analysis for parentage control in Austrian pigs. **Animal Biotechnology**. v. 12; p. 141-144, 2001.

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 Science**. v. 48, p. 307-314, 2003.

RON, M.; BLANC, Y.; BAND, M. *et al.* Misidentification rate in the israeli dairy cattle population and its implication for genetic improvement. **Journal of Dairy Science**. v. 79, p. 676-681. 1995.