



## **INFLUÊNCIA DA FORMA DE PRESERVAÇÃO DE OVÁRIO E OÓCITO NO TESTE DE PENETRAÇÃO ESPERMÁTICA IN VITRO**

**GHELLER, Stela Mari Meneghelo<sup>1</sup> ; CORCINI, Carine Dahl<sup>1</sup>; BRIZOLARA Rosa Maraní Rodrigues<sup>2</sup>; SILVA, Betris Erlet da<sup>2</sup>; DANIELI, Valquíria Maria<sup>1</sup>; SANTOS, Elisa Caroline da Silva<sup>1</sup>; VARELA JUNIOR, Antonio Sergio<sup>2</sup>; VIEIRA, Arnaldo Diniz<sup>1</sup>; BONGALHARDO, Denise Calisto<sup>2</sup>; LUCIA, Thomaz Jr.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Reprodução Animal - Faculdade de Veterinária – UFPel

<sup>2</sup>Laboratório de Biotécnicas da Reprodução de Aves – UFPel

<sup>3</sup>Instituto de Ciências Biológicas - FURG

Campus Universitário s/n – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900

Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS. [stelameneghellogheller@yahoo.com.br](mailto:stelameneghellogheller@yahoo.com.br)

### **1. INTRODUÇÃO**

Nos mamíferos a zona pelúcida do oócito é composta por glicoproteínas, mais especificamente ZP3 e ZPC, tem um papel fundamental na ligação do espermatozóide ao oócito (Wassarman, 1999). Teste de penetração em vitro tem sido realizados para analisar a capacidade do espermatozóide em atravessar essa zona pelúcida após a capacitação no trato reprodutivo da fêmea, esses tem sido direcionados para criopreservação de folículos ovarianos. 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 em seu experimento, que a taxa de penetração espermática utilizando oócitos frescos ou vitrificados não diferiram entre si, quando comparados 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.

Portanto é imprescindível a utilização de uma técnica que avalie de forma mais objetiva a capacidade fecundante de reprodutores suínos, otimizando assim a sua utilização. E devido o acondicionamento de forma simplificada de oócitos e ovários de suínos ainda não terem sido testados para a realização do teste de penetração com oócitos homólogos. Este trabalho objetivou avaliar o acondicionamento dos gametas femininos suínos para a realização do teste de penetração in vitro.

### **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

Os oócitos foram obtidos pela punção de folículos ovarianos seguindo a metodologia de leitoas pré-púberes, abatidas em frigorífico local, sendo armazenados em recipiente térmico com solução salina a 0.9% a 39°C até a chegada ao laboratório. A punção folicular foi realizada com auxílio de vácuo (aspira Max). O material obtido das punções foi colocado em tubo cônico de 15 ml, esperava-se 15 min para que ocorresse a sedimentação.

O material sedimentado era avaliado sob lupa estereomicroscópica para a busca de oócitos em placa de petri contendo PBS 1x. Esses foram divididos conforme o armazenamento do gameta feminino: oócito fresco (1); oócito armazenado por 48 horas em refrigerador doméstico a 5°C em placa de petri contendo pbs 1x (2); ovários congelado a -20°C em refrigerador doméstico sendo posteriormente descongelado em banho maria a 39°C (3). Sendo o meio utilizado para os três tratamentos MTBM com acréscimo de lactato de cálcio, cafeína e BSA. Após a busca foi feita 20 pipetagens com auxílio de micropipeta dosadora graduada em 100 µL para remoção das células do cumulus oophorus. Em cada tratamento foi utilizado uma alíquota de sêmen suíno de quatro machos da central de inseminação de Estrela – RS onde as amostras de sêmen foram diluídas em Beltsville Thawing Solution (Pursel & Jhonson, 1975) e acondicionadas a 15°C até seu uso. Sendo realizado pool desse sêmen para diminuir o efeito individual de cada macho em cada amostra de pool foi adicionado 5 ml de sêmen de dois machos formando uma alíquota de 10ml sendo centrifugado a uma 1900G por 10 minutos. De cada amostra centrifugada foram desprezados o sobrenadante, utilizando-se o pellet para o teste.

Os oócitos foram incubados em ependorf de 2 ml contendo MTBM em uma concentração de 2000 espermatozoides por ovócito por 6 horas em banho maria a 39°C para realização do teste de penetração. Passado o período de incubação os oócitos foram recuperados sob estereomicroscópio, lavados com micropipeta na mesma graduação anterior (para retirada dos espermatozoides acessórios) e submetidos a 100 microlitros de corante hoescht 33342 (Sigma®) por 15 minutos incubados a 38,5°C. As lâminas foram montadas proporcionando que os oócitos não estourassem e pudessem ser avaliados em microscópio de epifluorescência sob aumento de 400x. Para a realização da contagem foi verificado quantos espermatozoides ficaram penetrados na parte interna do oócito.

Os dados de taxa de penetração foi analisado utilizando o teste Qui-quadrado taxa de penetração e o número espermatozoides por oócitos Kruska wallis. Todas as análises estatísticas foram conduzidas através do software Statistix 8.0® (2003).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Dentro do sistema de incubação utilizado neste trabalho, não houve diferença nas taxas de penetração sofridas pelos oócitos frescos ou dos ovários congelados, porém os dois diferiram dos oócitos armazenados a 5°C por 48h ( $p < 0,0001$ ) (Tabela 1). A possibilidade de utilizar ovários congelados para o teste de penetração, sem que haja alterações na informação da capacidade de penetração in vitro é um dado relevante uma vez que não é necessário a utilização de crioprotetores ou o procedimento de congelamento ou vitrificação dos oócitos para a utilização desta técnica.

**Tabela1-** Os efeitos do modo de armazenamento dos gametas femininos para a execução do teste de penetração in vitro com oócitos homólogos de sêmen suíno.

Tratamento	Número de oócitos (n)	Taxa de penetração (n)	Número de espermatozóide por oócito
1	438	77,4% (339) <sup>b</sup>	2,23±1,95 <sup>b</sup>
2	295	86,55%(255) <sup>a</sup>	3,18±2,28 <sup>a</sup>
3	318	79,55% (253) <sup>b</sup>	2,63±2,29 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup>Expoentes distintos indicam significância estatística (P < 0,0001 ) 1= oócito fresco; 2 = óocitos armazenados por 48 horas a 5°C e 3= ovários congelados 20°C.

Tatemoto et al (1994) que utilizou oócitos de fêmea bovina oriundos de ovários congelados (-196°C) por até três meses, concluíram que pode ser utilizados no teste de penetração espermática para sêmen bovino. Porém a taxa de penetração foi menor quando foram utilizados oócitos oriundos de ovários congelados, comparado as taxas obtidas com oócitos frescos maturados in vitro (grupo controle), o que diferiu dos resultados encontrados neste experimento.

Os resultados encontrados por Holst et al (2000) avaliaram a capacidade de ligação de espermatozoides 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, estes resultados também diferiram dos resultados encontrados neste experimento, talvez este fato possa ser atribuído a temperatura de acondicionamento dos ovários. Pode-se verificar uma maior taxa de penetração nos oócitos que foram armazenados a 5°C, isso pode ser atribuído ao fato de nessa temperatura as células ainda continuem com seu metabolismo e desta forma fazendo com que as zonas de interação do espermatozóide/oócito sejam alterados, uma vez que este tratamento também apresentou maior número de espermatozoides por oócito.

#### 4. CONCLUSÃO

Com os resultados deste trabalho ficou evidente que é possível a utilização de oócito fresco ou oócitos procedentes de ovários congelados sem que se tenha perda na taxa de penetração in vitro.

#### 5. AGRADECIMENTO

Ao Cnpq pela bolsa de iniciação científica do primeiro autor, à CAPES pela bolsa de doutorado do segundo autor e FAPERGS pela bolsa de iniciação científica do quinto autor.

#### 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

MACEDO, M.C.; Deschamps, J.C.; Lucia, T. Jr. et al. 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.

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.

WASSARMAN, P.M. Mammalian fertilization: Molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis, and fusion. *Cell*. v. 96, p. 175-183, 1999.