



EFEITO DA CENTRIFUGAÇÃO ESPERMÁTICA SOBRE O TESTE DE PENETRAÇÃO OOCITÁRIA *IN VITRO*

SILVA, Betris Elert da¹; CORCINI, Carine Dahl²; BRIZOLARA, Rosa Maraní Rodrigues¹; GHELLER, Stela Mari Menegello²; DANIELE, Valquíria Maria²; SANTOS, Elisa Caroline da Silva³; VARELA JUNIOR, Antonio Sérgio³; VIEIRA, Arnaldo Diniz²; LUCIA Jr, Thomaz²; Bongalhardo, Denise Calisto¹;

¹Laboratório de Biotécnicas da Reprodução de Aves- Instituto Biologia-UFPel

²Laboratório de Reprodução Animal- Faculdade de Veterinária – UFPel

³Instituto de Ciências Biológicas – FURG

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

Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS. betris-elert@ig.com.br

1. INTRODUÇÃO

Antes do teste de penetração oocitária, é feita a lavagem do sêmen para a remoção do plasma seminal; neste processo os espermatozóides são centrifugados e ressuspensos (Macedo Jr, 2007). Segundo Matas et al. (1996), esta lavagem seminal pode comprometer a integridade da membrana de até 35% dos espermatozóides. Dependendo do meio no qual os espermatozóides são ressuspensos, pode ocorrer um estímulo à capacitação e à reação acrossomal espontânea (Almiñana et al., 2005). Este tratamento de capacitação também pode aumentar a susceptibilidade dos espermatozóides à subseqüentes danos de membrana, sendo que em suínos, ejaculados do mesmo macho provavelmente reajam de forma diferente a um mesmo tratamento de capacitação (Matas et al., 1996). O grande desafio dos testes de penetração oocitária é identificar um protocolo que proporcione iguais condições de expressão da capacidade fertilizante para todas as amostras (Macedo, 2007). A utilização de espermatozóides não lavados e não préincubados poderia diminuir a variabilidade entre réplicas (Matas et al., 1996).

Este trabalho propõe-se a avaliar o efeito da centrifugação dos espermatozóides suínos sobre o teste de penetração *in vitro* em oócitos homólogos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização deste experimento foram utilizados pools de sêmen de 4 machos suínos com fertilidade conhecida, oriundos de uma central de inseminação artificial. Somente ejaculados que apresentaram motilidade $\geq 70\%$, vigor ≥ 3 e um mínimo de 85% de células normais foram utilizados para formar os pools (ejaculados de dois machos).

Para o teste de penetração oocitária foram utilizados oócitos de ovários de porcas pré-puberes coletados em um frigorífico local. Os ovários foram acondicionados em uma garrafa isotérmica com solução salina à 39°C e transportados ao laboratório, onde foram puncionados com um aparelho de vácuo (aspira Max). O material obtido das punções foi colocado em um tubo cônico de 15 mL, após 15 min o sedimento formado foi transferido para uma placa de Petri contendo PBS 1% e observado sob lupa estereomicroscópica para procura e seleção dos oócitos.

Para a realização do teste foram utilizados 24 oócitos desnudados mecanicamente e incubados com o sêmen no meio BTS com lactato de cálcio, cafeína e BSA, em banho maria à 39°C por 6 horas. No tratamento 1 o sêmen não sofreu o processo de centrifugação e no tratamento 2 o sêmen foi centrifugado por 5 minutos, 1900 xg. Após a incubação, os complexos oócito-espermatozóide foram retirados com uma micropipeta de uma só vez e colocados em uma placa de Petri; os oócitos foram transferidos para um tubo *ependorf* com PBS1% e submetidos à 20 pipetagens com a função de retirar espermatozoides acessórios. Para a verificação do teste de penetração oócito-espermatozóide, os oócitos foram expostos à solução de Hoescht e incubados em estufa por 15 minutos à 38,5° C. Após, as lâminas foram montadas de forma a evitar o rompimento dos oócitos e avaliadas em microscópio de epifluorescência no aumento de 200X. Foram avaliados o número de espermatozóide por oócito e o número de oócitos penetrados (taxa de penetração).

O número médio de espermatozoides que penetraram por oócito foi comparado entre os tratamentos através de análise de variância; comparações entre médias foram conduzidas pelo teste LSD. Os efeitos dos tratamentos sobre a taxa de penetração espermática *in vitro* foram avaliados através de Qui-quadrado. Todas as análises estatísticas foram conduzidas com o software Statistix® (2003).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do número de espermatozoides por oócito e da taxa de penetração dos dois tratamentos são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Efeitos da centrifugação do sêmen suíno no número de espermatozoides por oócito (média ± desvio padrão) e na taxa de penetração em oócitos frescos.

Tratamento ¹	Número de oócitos (n)	Taxa de penetração (n)	Número de espermatozoides por oócito
1	467	50,54% (236) ^b	0,98 ± 1,29 ^b
2	490	72,9% (357) ^a	1,54 ± 1,44 ^a

¹ 1= sêmen com BTS sem centrifugação; 2 = sêmen com BTS com centrifugação

^{a, b} Expoentes distintos indicam significância estatística (P < 0, 0001)

No tratamento 2, onde o sêmen foi submetido à centrifugação, a taxa de penetração (número de oócitos penetrados) foi maior do que no tratamento 1, sem centrifugação. O número de espermatozóides por oócito também foi maior no tratamento 2 do que no tratamento 1. De acordo com Matas et al. (2007), os espermatozóides suínos são influenciados não somente pelo doador, mas também pela manipulação do sêmen. Nossos resultados demonstram que a manipulação do sêmen através de centrifugação influenciou a habilidade de penetração oocitária, possivelmente por desencadear o processo de capacitação espermática, resultando em um maior número de espermatozóides sofrendo reação acrossomal e, conseqüentemente, em um maior número com habilidade para penetrar os oócitos.

4. CONCLUSÃO

Pode-se concluir que a centrifugação do sêmen antes da realização do teste de penetração oocitária proporciona uma maior taxa de penetração, bem como um maior número de espermatozóides por oócito do que o sêmen não centrifugado.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

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.

MATAS, C.; MARTINEZ, E.; VAZQUEZ, 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.

STATISTIX 8.0, 2003. **Computer Program** – Analytical Software.