

# INFLUÊNCIA DA FORMA DE PRESERVAÇÃO DE OVÁRIOS E OÓCITOS NO TESTE DE PENETRAÇÃO ESPERMÁTICA IN VITRO

**DANIELI, Valquíria Maria<sup>1</sup>; CORCINI, Carine Dahl<sup>1</sup>; BRIZOLARA Rosa Marani Rodrigues<sup>3</sup>; SILVA, Betris Erlet da<sup>3</sup>; GHELLER, Stela Mari Meneghello<sup>1</sup>; SANTOS, Elisa Caroline da Silva<sup>2</sup>; VARELA JUNIOR, Antonio Sergio<sup>2</sup>; VIEIRA, Arnaldo Diniz<sup>1</sup>; BONGALHARDO, Denise Calisto<sup>3</sup>; LUCIA, Thomaz Jr. <sup>1</sup>**

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

<sup>2</sup>Instituto de Ciências Biológicas - FURG

<sup>3</sup>Laboratório de Biotécnicas da Reprodução de Aves - UFPel

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

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

## INTRODUÇÃO

O teste de penetração *in vitro* é realizado como uma forma de avaliar a fertilidade do macho, porém para a execução do mesmo é necessário a obtenção de oócitos. Segundo Macedo et al (2006) demonstraram 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.

Porém para vitrificação é necessário laboratório com condições adequadas além de meios especializados para esta. Portanto alternativas para o acondicionamento de forma simplificada de oócitos e ovários de suínos que ainda não foram testados objetivando a utilização dos mesmos para a realização do teste de penetração com oócitos homólogos. O objetivo foi avaliar o acondicionamento dos gametas femininos suínos para a realização do teste de penetração *in vitro*.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Os oócitos foram obtidos pela punção de folículos ovarianos, de fêmeas pré-púberes, abatidas em frigorífico local, sendo os mesmos armazenados em recipiente térmico com solução salina a 39°C. A punção folicular foi realizada com auxílio de vácuo. O material obtido da punções foi colocado em tubo cônico de 15 ml, esperava-se 15 min para que ocorresse a sedimentação. O sedimento era avaliado sob lupa estereomicroscópica para avaliação dos oócitos em placa de petri contendo PBS 1x. Esses foram divididos conforme o armazenamento do gameta feminino: oócito fresco; oócito armazenado por 48h em refrigerador doméstico a 5°C em PBS 1x; ovários congelado a -20°C. O meio utilizado nos tratamentos foram BTS 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 espermática do pool de sêmen suíno de dois machos que foram centrifugados a 1900 G por 10 min. Os oócitos foram incubados em Beltsville Thawing Solution (BTS) com uma concentração de 2000 espermatozóides por ovócito por 6 h em banho maria a 39°C. Após a incubação os oócitos foram recuperados sob lupa estereomicroscópica, e pipetados para retirada dos espermatozóides acessórios. Após foram submetidos a

100 µL de corante hoescht 33342 por 15 min a 38,5°C. As lâminas foram montadas e avaliadas em microscópio de epifluorescência sob aumento de 400x. Para a realização da contagem foi verificado quantos espermatozóides ficaram penetrados na parte interna do oócito.

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

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

Dentro do sistema de incubação utilizado neste trabalho, não houve diferença nas taxas de penetração sofridas pelos oócitos armazenados por 48 h a 5°C e ovários congelados -20°C, porém os dois diferiram dos oócitos frescos ( $p < 0,05$ ) (Tabela 1).

**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	490	72,8% (357) <sup>a</sup>	1,54±1,44 <sup>a</sup>
2	438	47,03%(206) <sup>b</sup>	1,15±1,65 <sup>b</sup>
3	383	51,95% (199) <sup>b</sup>	1,16±1,56 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup>Exponentes distintos indicam significância estatística ( $P < 0,05$ ) 1 = oócitos frescos; 2 = oócitos armazenados por 48 horas a 5°C e 3 = ovários congelados - 20°C.

Os resultados deste experimento concordam com o encontrado por Tatemoto et al (1994) em oócitos de fêmea bovina oriundos de ovários congelados (-196°C) que pode objetivaram uma menor taxa de penetração com oócitos oriundos de ovários congelados, comparado as taxas obtidas com oócitos frescos maturados *in vitro*.

No trabalho de Holst et al (2000) que 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, estes resultados também concordam dos resultados encontrados neste experimento. Porém os oócitos frescos apresentaram uma maior taxa de polispermia do que s demais tratamentos.

## CONCLUSÃO

Com os resultados deste trabalho ficou evidente que é possível a utilização de oócitos resfriados ou procedentes de ovários congelados sem acarretar perda na taxa de penetração *in vitro* quando utilizado com o meio de incubação o BTS.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

MACEDO, M.C.; DESCHAMP, 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.