

## **PADRONIZAÇÃO DA FECUNDAÇÃO IN VITRO DE OÓCITOS SUÍNOS COM SÊMEN CRIOPRESERVADO**

Alceu Mezzalira<sup>1</sup>, Cláudio Francisco Brogni<sup>2</sup>, Lain Uriel Olheiler<sup>3</sup>, Joana Claudia Mezzalira<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Orientador, Departamento de Medicina Veterinária, CAV – alceu.mezzalira@udesc.br

<sup>2</sup> Acadêmico do Curso de Medicina Veterinária, CAV - bolsista PROBIC/UDESC

<sup>3</sup> Doutorando em Ciência Animal, CAV

Palavras-chave: Criopreservação. Sêmen Suíno. Patologia Espermática.

A reprodução assistida em suínos está menos desenvolvida em relação a outros mamíferos de interesse zootécnico. A criopreservação de sêmen e a fecundação in vitro são ferramentas adequadas para conservar linhagens em risco de extinção. Este trabalho teve como objetivo criopreservar e avaliar o sêmen coletado a partir do epidídimo de três raças, Caruncho, Moura e Cruzamento Industrial, comparando com sêmen ejaculado de outro macho de Cruzamento Industrial. A cauda do epidídimo foi drenada com a infusão de diluente de resfriamento através de uma seringa acoplada a uma agulha romba. O sêmen obtido foi diluído 1:1 em diluente de resfriamento (DR) à 32 °C, e mantido à temperatura ambiente (22- 26 °C) por 90 minutos. Após determinar a concentração, o ejaculado foi diluído novamente até atingir a concentração de  $2 \times 10^9$  espermatozoides/mL. O sêmen foi mantido à 5 °C por 90 minutos e, após esse período foi adicionado igual volume do diluente de congelamento (DC) obtendo a concentração final de  $1 \times 10^9$  espermatozoides/mL. O sêmen foi então envasado em palhetas médias (0,5 mL), que foram mantidas em vapor de nitrogênio (-120°C) por 20 minutos e posteriormente mergulhadas no mesmo. Imediatamente após o descongelamento e com 15, 30 e 45 minutos de incubação a 38,8 °C foi confeccionado um esfregaço dos espermatozoides imediatamente antes e logo após o processo de centrifugação em gradiente de Mini Percoll. Os esfregaços foram corados com vermelho congo e violeta genciana, e avaliados os defeitos maiores e menores, segundo (Blom, 1973). O sêmen do macho Moura foi usado em uma rotina de fecundação in vitro (FIV), sendo avaliadas a taxa de clivagem no dia 2 e de blastocistos no dia 7 de cultivo. Observou-se uma grande variação das patologias espermáticas em função da raça avaliada. Verificou-se ainda uma redução das patologias após a submissão ao Percoll (Tabela 1). Os defeitos maiores mais frequentes foram: gota proximal, cauda fortemente enrolada, cauda enrolada sobre a cabeça, enquanto os defeitos menores mais observados foram: gota distal, cabeça solta normal e cauda simplesmente enrolada. Para o macho CRZ-EJA em todos os períodos de incubação houve diminuição dos defeitos maiores e menores após o Percoll. Isso foi motivado pela seleção imposta pelo gradiente, que possibilita que apenas os espermatozoides com maior motilidade consigam transpor as barreiras impostas pelo Percoll. No macho Moura essa característica não foi observada, pois não houve redução dos defeitos maiores em nenhum dos períodos de avaliação. Já os defeitos menores reduziram em todos os períodos de incubação. No CRZ-IN apenas no tempo zero no pós percoll houve diminuição dos defeitos maiores, enquanto no macho Caruncho

apenas na avaliação de 30 minutos isto ocorreu. No macho CRZ-IN houve diminuição de defeitos menores nos tempos 30 e 45 minutos e no Caruncho nos períodos 0, 30 e 45 minutos pós percoll.

**Tab. 1** Porcentagens de defeitos maiores e defeitos menores de sêmen criopreservado obtido de epidídimo de machos: cruzamento industrial (CRZ- IN); raça Moura e raça Caruncho, comparados com sêmen ejaculado de macho Cruzamento Industrial (CRZ- EJA). Foram avaliadas as patologias antes e após o gradiente de Mini Percoll (pré e pós percoll), nos diferentes tempos (0, 15, 30 e 45 minutos) após o descongelamento.

Macho	Períodos de incubação	Defeitos maiores		Defeitos menores	
		Pré-Percoll	Pos-Percoll	Pré-Percoll	Pos-Percoll
CRZ- EJA	0 min	8.0 <sup>ba</sup>	1.5 <sup>ab</sup>	23.5 <sup>aY</sup>	5.0 <sup>aX</sup>
	15 min	10.5 <sup>ba</sup>	1.5 <sup>ab</sup>	25.5 <sup>aY</sup>	3.5 <sup>aX</sup>
	30 min	19.0 <sup>aA</sup>	4.5 <sup>aB</sup>	19.0 <sup>aY</sup>	5.5 <sup>aX</sup>
	45 min	9.5 <sup>ba</sup>	2.5 <sup>ab</sup>	23.5 <sup>aY</sup>	2.5 <sup>aX</sup>
CRZ- IN	0 min	11.0 <sup>aA</sup>	3.5 <sup>abB</sup>	25.5 <sup>bcX</sup>	27.5 <sup>aX</sup>
	15 min	4.5 <sup>ba</sup>	4.0 <sup>ba</sup>	20.5 <sup>cX</sup>	17.0 <sup>cX</sup>
	30 min	4.0 <sup>ba</sup>	7.5 <sup>aA</sup>	35.0 <sup>aY</sup>	20.5 <sup>bcX</sup>
	45 min	4.5 <sup>ba</sup>	3.5 <sup>abA</sup>	33.0 <sup>abY</sup>	20.5 <sup>bcX</sup>
MOURA	0 min	4.5 <sup>aA</sup>	1.5 <sup>aA</sup>	74.5 <sup>aY</sup>	17.0 <sup>aX</sup>
	15 min	0.5 <sup>ba</sup>	3.0 <sup>aA</sup>	65.0 <sup>bY</sup>	8.5 <sup>bX</sup>
	30 min	2.5 <sup>a<sup>b</sup>A</sup>	0.5 <sup>aA</sup>	55.5 <sup>bcY</sup>	10.0 <sup>bX</sup>
	45 min	3.5 <sup>aA</sup>	1.5 <sup>aA</sup>	48.0 <sup>cY</sup>	7.5 <sup>bX</sup>
CARUNCHO	0 min	4.0 <sup>abA</sup>	2.5 <sup>aA</sup>	32.5 <sup>aY</sup>	4.5 <sup>bX</sup>
	15 min	0.0 <sup>cA</sup>	1.0 <sup>aA</sup>	21.0 <sup>bY</sup>	15.0 <sup>aY</sup>
	30 min	6.5 <sup>aA</sup>	1.0 <sup>aB</sup>	13.5 <sup>cY</sup>	6.0 <sup>bX</sup>
	45 min	2.0 <sup>ba</sup>	2.0 <sup>aA</sup>	25.5 <sup>abY</sup>	4.5 <sup>bX</sup>

<sup>a,b,c</sup> Letras minúsculas na coluna significam diferença para o mesmo animal;

<sup>A,B; Y,X</sup> Letras maiúsculas na mesma linha significam diferença para os defeitos maiores ou menores para o mesmo animal e período de incubação.

Essa variação resulta das características individuais de cada raça e principalmente da particularidade do sêmen obtido no epidídimo. Em relação aos dados da FIV, a taxa de clivagem foi de 40% (16/40) no tempo zero, 33% (13/39) no tempo 15 minutos, 35% (15/42) no tempo 30 minutos e 34% (13/38) no tempo 45 minutos. Já as taxas de blastocistos foram 5% (2/40), 0% (0/40), 2,3% (1/42) e 7,8% (3/38) nos tempos 0, 15, 30 e 45 minutos, respectivamente. Com os dados parciais podemos inferir que um maior tempo (45 minutos) de incubação dos espermatozoides sugere uma maior produção de blastocistos, o que se torna indispensável para uma melhor adequação da FIV, e que após o Percoll ocorre uma considerável redução das patologias espermáticas. Novas repetições são necessárias para confirmar os dados encontrados até o momento.

**BLOM E. Ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram.** Nord Vet Med, v.25, p.383-391, 1973.