

RELAÇÃO ENTRE A FECUNDAÇÃO *IN VITRO* E A REAÇÃO ACROSSOMAL EM TOUROS NELORE COM ALTO E BAIXO DESEMPENHO A CAMPO.

Watanabe, Y.F.¹; Franceschini, P.H.²; Feliciano Silva, A.E.D.³; Lôbo, R.B.¹

¹ Depto de Genética - FMRP/USP, Ribeirão Preto - SP

² Depto de Reprodução Animal - FCAVJ/UNESP, Jaboticabal - SP

³ EMPRAPA - CPPSE, Caixa Postal 339, São Carlos - SP

58279

INTRODUÇÃO

A aplicação a campo dos avanços das biotécnicas relacionadas à reprodução do macho deve ser utilizada como uma grande ferramenta no melhoramento genético, uma vez que o uso da inseminação artificial pode levar à multiplicação de genes indesejáveis no rebanho. Portanto, é imprescindível a escolha de reprodutores previamente selecionados e testados evitando-se, desta forma, a utilização de animais com alterações reprodutivas que possam interferir na fertilidade do mesmo e, principalmente, na transmissão de características indesejáveis aos descendentes.

São várias as características reprodutivas utilizadas em um programa de melhoramento genético, dentre elas podemos citar a avaliação do sêmen quanto à patologia espermática, motilidade e concentração de espermatozoides, teste de libido, capacidade de serviço, circunferência escrotal, entre outras. Atualmente, novas tecnologias estão sendo empregadas na avaliação de reprodutores, como por exemplo a morfologia e integridade do acrossoma, a capacidade do espermatozoide em sofrer reação acrossomal, a avaliação da taxa de fecundação *in vitro* e a subsequente habilidade do zigoto em desenvolver até o estágio de blastocisto, além dos estudos referentes à presença de fatores no plasma seminal que podem influenciar a fertilidade (MARQUANT-LE GUIENNE *et al.*, 1990; KILLIAN *et al.*, 1993; WATANABE, OLIVEIRA FILHO, 1994; WATANABE *et al.*, 1995, 1996).

Como as características padrões utilizadas na avaliação do sêmen (concentração, motilidade e integridade do acrossoma) são fracamente correlacionadas com a fertilidade de touros (BLOTTNER *et al.*, 1990), o objetivo do presente trabalho foi analisar a relação entre a fertilidade *in vivo* (nº inseminações/nascimento), *in vitro* (produção *in vitro* de embriões) e a taxa de reação acrossomal de touros da raça Nelore.

MATERIAL E MÉTODO

Baseado na taxa de nascimento, os touros foram ranqueados de acordo com o número de doses de sêmen utilizadas por nascimento, resultando em 2,14 doses (103/48) e 1,47 doses (93/63) para os touros de baixo e alto desempenho a campo, respectivamente.

Para a produção *in vitro*, os oócitos foram aspirados de ovários obtidos em abatedouros. Somente os oócitos viáveis foram maturados *in vitro* em TCM199 suplementado com 5µg FSH/ml e 5µg LH/ml e 10% de soro fetal bovino (SFB) em incubadora a 38,8°C, 5% CO₂ em ar, durante 23-25 horas. Em seguida, os oócitos foram fecundados *in vitro*, onde o sêmen foi submetido à técnica de gradiente de Percoll para selecionar os espermatozoides vivos e eliminar o diluidor e plasma seminal. A concentração espermática foi de 2 e 4x10⁶ células/ml e a concentração de heparina ajustada para 0,1-1,0-10,0 e 20,0µg/ml. Após 18-20 horas da inseminação, os oócitos foram desnudados e cultivados *in vitro* em monocamada de células Vero em meio Mênèzo. A taxa de blastocisto foi observada após 7-9 dias de co-cultivo.

No estudo da reação acrossomal, o sêmen foi descongelado e lavado duas vezes em meio TALP. A seguir, a concentração espermática ajustada para 20x10⁶ spz/ml, a qual foi distribuída em microtubos, com uma concentração de heparina de 10µg/ml, mantidos sob agitação constante a 37°C (Thermomixer). Após 4 horas de incubação adicionou-se 100µg/ml de LPC (Lysophosphatidilcoline), permanecendo por mais 15 minutos. Para a determinação da reação acrossomal foram preparados esfregaços para coloração com eritrosina e ácido flavianico (Eritrosina B/Yellow S) às 0, 2 e 4:15 horas de incubação. No entanto, esta técnica não permite diferenciar a reação acrossomal de espermatozoides vivos da reação acrossomal falsa causada pela perda do acrossoma de espermatozoides mortos. Por isso, realizou-se a coloração dupla com Giemsa e Trypan blue onde é possível detectar 4 categorias de espermatozoides: 1) mortos com

acrossoma intacto, 2) mortos com acrossoma degenerado (falsa reação), 3) vivos com acrossoma intacto e 4) vivos com acrossoma reagente (reação verdadeira).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados na Tabela 1 são relativos à produção de blastocistos e porcentagem de espermatozoides que sofreram reação acrossomal. Em relação à taxa de blastocistos os dados foram agrupados para as 2 concentrações de espermatozoides e as 4 concentrações de heparina, uma vez que não foi observada diferença entre os grupos. A taxa de reação acrossomal foi observada após 4:15 horas de incubação.

Tabela 1. Porcentagem de reação acrossomal (RA) e produção *in vitro* de blastocistos (BL) utilizando touros Nelore de alto (T1) e baixo (T2) desempenho a campo.

Touros	% RA (sptz reagentes/sptz total)	% BL (embriões/oócitos)
T1	34,0 (68/200) ^a	19,9 (86/432) ^a
T2	14,0 (28/200) ^b	3,3 (11/336) ^b

^{a,b} P<0,001

Os touros de alto desempenho a campo apresentaram melhores taxas de blastocistos e reação acrossomal quando comparado ao touro de baixo desempenho sugerindo uma relação significativa entre a fertilidade *in vivo* (desempenho a campo) e a *in vitro*. O mesmo foi observado por MARQUANT-LE GUIENNE *et al.* (1990), onde o índice de correlação foi de 0,83. Quanto à reação acrossomal, os resultados foram significativamente diferentes entre os touros, corroborando com os experimentos de BLOTTNER *et al.*, (1990), onde observaram correlação significativa entre a reação acrossomal e a fertilidade *in vivo* (r=0,61) e a *in vitro* (r=0,62).

Concluindo, a aplicação desta características na seleção de reprodutores é de grande interesse aos programas de inseminação artificial e fecundação *in vitro*, uma vez que estes parâmetros estão correlacionados com a fertilidade a campo.

BIBLIOGRAFIA

- BLOTTNER, S.; NEHRING, H.; TORNER, H. Individual differences in capacitation of bull spermatozoa by heparin *in vitro*: relationship to fertility. **Theriogenology**, v.34, p.619-628, 1990.
- KILLIAN, G.J.; CHAPMAN, D.A.; ROGOWSKI, L.A. Fertility associated proteins in Holstein bull seminal plasma. **Biol. Reprod.**, v.49, p.1202-1207, 1993.
- MARQUANT-LE GUIENNE, B.; HUMBLLOT, P.; THIBIER, M.; THIBAUT, C. Evaluation of bull semen fertility by homologous *in vitro* fertilization tests. **Reprod. Nutr. Dev.**, v.30, p.259-266, 1990.
- WATANABE, Y.F.; OLIVEIRA FILHO, E.B. Efeito de touros na produção *in vitro* de embriões bovinos. **Zootecnia, Nova Odessa**, v. 32, p.35, 1994b.
- WATANABE, Y.F.; WATANABE, M.R.; PERIPATO, A.C.; GALERANI, M.A.V.; VILA, R.A.; LÔBO, R.B. A fecundação *in vitro* como critério de seleção para fertilidade em tourinhos da raça Nelore. **Rev. Bras. Gen.**, v. 18, p.236, 1995.
- WATANABE, Y.F.; AZAMBUJA, R.M.; WATANABE, M.R.; PERIPATO, A.C.; GALERANI, M.A.V.; VILA, R.A.; LÔBO, R.B. Efeito de touros na produção *in vitro* de embriões com diferentes concentrações de heparina e de espermatozoides. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v. 24, p. 250, 1996.