

INFLUÊNCIA DO SÉMEN DE DIFERENTES TOUROS SOBRE AS TAXAS DE FERTILIZAÇÃO *IN VITRO* E DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES EM CO-CULTURA.

C.C. Marques, M.C. Baptista, R.M. Pereira, M.I. Vasques, L.F. Lopes da Costa¹, A.E.M. Horta.

Estação Zootécnica Nacional, Vale de Santarém - 2000 Santarém.

¹ Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa.

(Este artigo foi aceite para publicação em 30 de Outubro de 1995)

RESUMO

São apresentados os resultados relativos às taxas de fertilização *in vitro* (FIV) e desenvolvimento de embriões em co-cultura com células da granulosa em monocamada. Foi estudado o efeito do sémen de 5 touros diferentes sobre aqueles parâmetros. Durante o ano de 1994, realizaram-se 63 sessões a partir de uma população de 15544 oocitos aspirados de 2326 ovários bovinos colhidos em matadouro. Em cada sessão de fertilização utilizaram-se pelo menos dois dos touros estudados, tendo-se inseminado 10563 oocitos maturados (a partir de 12063 oocitos colocados em cultura). O sémen utilizado na fertilização *in vitro* foi previamente tratado pela técnica do *swim-up*. A concentração de espermatozóides obtida foi avaliada por densidade óptica. Quer a taxa de fertilização (mínimo: $21,9 \pm 8,6\%$, máximo: $50,8 \pm 3,3\%$), quer a taxa de sobrevivência embrionária (mínimo: $15,8 \pm 4,5\%$, máximo: $32,6 \pm 3,4\%$) foram influenciadas pelo factor touro. Não existiu correlação entre a taxa de fertilização e a sobrevivência dos embriões ($r=0,56$; $P>0,05$). A concentração espermática após o *swim-up* esteve correlacionada com a taxa de sobrevivência dos embriões ($r=0,95$; $P<0,05$), mas não apresentou correlação com a taxa de fertilização ($r=0,44$; $p>0,05$). Touros da mesma raça apresentaram diferenças significativas quer para a taxa de fertilização, quer para a taxa de sobrevivência embrionária. Lotes diferentes do mesmo touro apresentaram taxas de fertilização significativamente diferentes

INTRODUÇÃO

A selecção de touros para a fertilização de oocitos e produção de embriões *in vitro* reveste-se de grande importância na garantia de rendimentos aceitáveis desta técnica, pois as características do sémen e a qualidade dos oocitos são dois factores determinantes em todo o processo de fertilização *in vitro* (Lonergan, 1994).

Tem sido referida uma elevada variabilidade da taxa de fertilização *in vitro* associada ao factor touro (Shi *et al.*, 1990), manifestando-se ao nível das percentagens de clivagem (taxa de fertilização) e de embriões que atingem o estadio de blastocito, bem como e da viabilidade dos embriões produzidos (DeJarnette *et al.*, 1992; Sacke *et al.*, 1994).

Outros autores referem ainda variações associadas à utilização de diferentes lotes de sémen do mesmo touro e mesmo de diferentes palhinhas do mesmo lote (Otaí *et al.*, 1993).

Este trabalho teve por objectivo comparar os resultados referentes à FIV e crescimento de embriões em co-cultura entre touros de raças diferentes, utilizados no nosso laboratório durante o ano de 1994.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Aspiração folicular e maturação dos oocitos

Os ovários de bovino foram colhidos no matadouro local de Santarém (Santacarnes), imediatamente após o abate, e transportados para o laboratório de embriologia (EZN) em solução salina fosfatada e tamponada (PBS) a 37° C. O intervalo de tempo entre a recolha dos ovários e o seu processamento no laboratório não excedeu, em média, duas horas. No laboratório, os ovários são lavados duas a três vezes em PBS e colocados em banho-maria a 37° C. Procede-se então à aspiração do líquido folicular a partir dos folículos não atrésicos de 2 a 6 mm de diâmetro. A recolha e selecção dos complexos *cumulus* - oocito é feita à lupa em meio de lavagem próprio. Os oocitos são seguidamente colocados em cultura durante 24 horas em atmosfera saturada de humidade com 5% de CO₂ a 39° C. O meio de cultura dos oocitos é constituído por TCM-199 suplementado com 10% de soro de vaca em cio (OCS) e antibiótico. Após a cultura, os oocitos são libertados das células do *cumulus-oophorus* através de passagens sucessivas em meio próprio com pipeta fina e colocados em gotas de 40 µl de meio de fertilização (meio Tyrodes modificado, suplementado com heparina e cafeína). A este meio serão adicionados os espermatozóides (spz) depois de sofrerem um processo de lavagem e selecção (*swim-up* e centrifugação).

2. Capacitação e fertilização

O sémen é preparado segundo a técnica de Lu *et al.* (1987), em meio Tyrodes sem Ca²⁺. Após a descongelação, realizada a 37-38°C durante 30-40 segundos, o sémen é colocado em tubos de vidro onde se encontra o meio de capacitação, indo a incubar em atmosfera de 5% de CO₂ a 39° C durante cerca de 60 minutos. Após o *swim-up*, retira-se o

sobrenadante (contendo os spz que conseguiram subir no meio) para tubos de fundo cônico e procede-se à sua centrifugação a 1800 r.p.m. durante 10 minutos. O eluato concentrado com spz é distribuído (cerca de 4 µl por gota) pelas gotas de meio contendo os oocitos maturados para permitir a fertilização. A concentração final de spz obtida é avaliada por fotometria em que a densidade óptica é convertida em concentração espermática, utilizando uma equação ajustada anteriormente por contagens sucessivas ao microscópio (em hematocitômetro de Neubauer), utilizando os valores médios (5 leituras) de 9 pontos representando as concentrações esperadas ($Y = a \cdot X^b$, $R^2=0,987$; Figura 1).

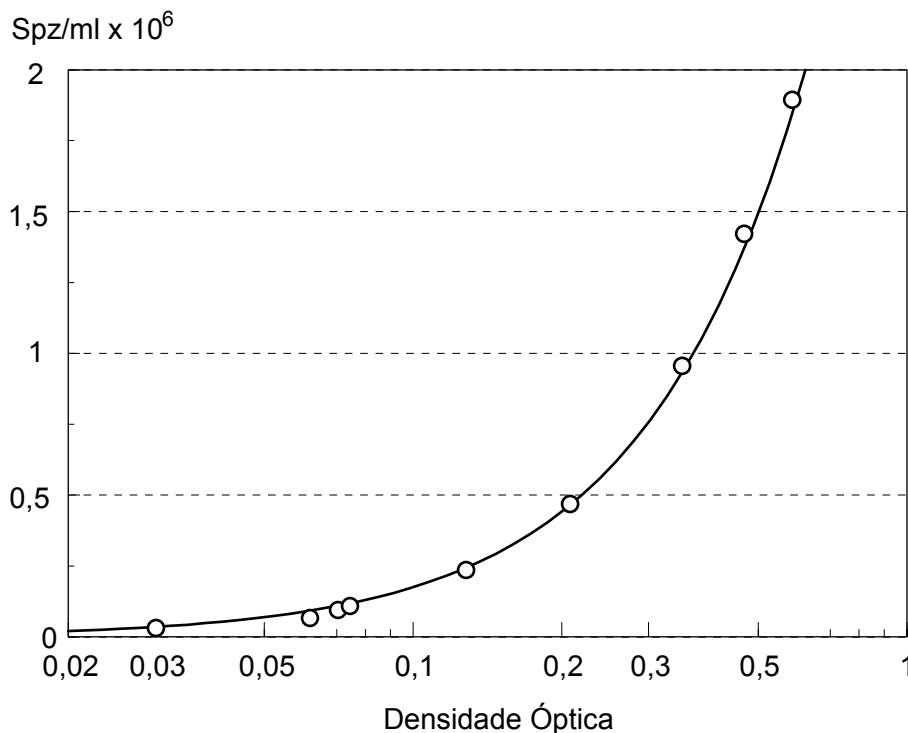


Figura 1 - Equação *standard* utilizada para determinar a concentração de espermatozoides após o *swim-up* a partir dos valores da densidade óptica obtidos por fotometria ($spz/ml = 3756687,6 \cdot X^{1,3302942}$).

Vinte e duas a vinte e quatro horas após a fertilização e nas condições de incubação já descritas, os oocitos inseminados são transferidos para placas de cultura com monocamada de células da granulosa e, 24 horas depois, calcula-se a taxa de fertilização pela contagem dos embriões clivados (2-4 células). Os oocitos fertilizados continuam em co-cultura até à fase de mórula compacta ou jovem blastocito (8 dias de idade).

Os resultados apresentados dizem respeito a uma população inicial de 15544 oocitos aspirados de 2326 ovários de várias raças bovinas. Foram inseminados 10563 oocitos a partir de 12063 colocados em cultura, traduzindo-se numa taxa de maturação média de $78 \pm 11\%$ (média \pm dp). Estes oocitos foram fertilizados com o sémen dos seguintes touros: Chic, Vinícola e Fritz da raça Charolesa, Calipso (Frísia) e Esmo (Alentejana). O touro Chic não entra na comparação dos resultados relativos ao

desenvolvimento embrionário visto que nas 4 sessões de fertilização em que entrou não conseguiu apresentar amostragem suficiente para tratamento estatístico ulterior. Para dois lotes de sémen do touro Calipso realizou-se a comparação relativamente à taxa de fertilização (Lote1: n=17, congelado a 26/11/90; Lote2: n=27, congelado a 22/7/91).

A taxa de fertilização (oocitos fertilizados/oocitos maturados), concentração de spz, e taxa de sobrevivência dos embriões em cultura (embriões viáveis com 8 dias de idade/embriões clivados), reflectem as médias de diferentes sessões para cada touro. Em cada sessão de fertilização utilizou-se o sémen de, pelo menos, dois dos 5 touros comparados. As médias obtidas foram comparadas por análise de variância e teste das menores diferenças significativas (LSD) (Statgraphics, 1986). Os desvios às médias apresentados no texto representam o erro padrão interno. As correlações apresentadas foram calculadas pelo método de Pearson (Statgraphics, 1986).

RESULTADOS

Na tabela 1 apresentam-se os resultados relativos à taxa de fertilização *in vitro* obtidos com cinco touros diferentes num total de 135 sessões de trabalho. Houve diferenças significativas entre os touros estudados ($P < 0,0049$), registando-se coeficientes de variação das médias muito elevados (35-79%). A taxa de fertilização mais elevada foi a conseguida pelo touro de raça Alentejana Esmo ($50,8 \pm 3,3\%$) e a mais baixa do touro Chic de raça Charolesa ($21,9 \pm 8,6\%$). Dois dos três touros de raça Charolesa mostraram diferenças significativas entre si ($21,9 \pm 8,6\%$ vs $49,4 \pm 3,8\%$, respectivamente para os touros Chic e Fritz).

Tabela 1 - Taxas de fertilização obtidas com sémen de diferentes touros (Análise de variância e LSD das médias)

Touro	(n)	Média	EP interno	Coef. Var.	LSD das médias (95%)	
Chic	4	0,2191 a	0,0860	0,79	0,0756	0,3626
Vinicola	9	0,3512 ab	0,0793	0,68	0,2556	0,4469
Calipso	67	0,3855 a	0,0262	0,56	0,3505	0,4206
Fritz	20	0,4941 bc	0,0384	0,35	0,4299	0,5582
Esmo	35	0,5080 c	0,0335	0,39	0,4595	0,5565
Total	135	0,4262	0,0177	0,50	0,4015	0,4509

Médias com sobrescritos diferentes apresentam diferenças significativas ($P < 0,0049$)

Observaram-se diferenças significativas entre dois lotes de sêmen do mesmo touro (Calipso) relativamente à taxa de fertilização (lote1: $46,9 \pm 3,8\%$ vs lote2: $31,7 \pm 3,8\%$; $P < 0,01$).

A concentração espermática média obtida depois da capacitação foi idêntica entre os touros Vinícola, Calipso e Esmo (210.016 spz/ml, 345.142 spz/ml e 262.023 spz/ml, respectivamente; $P > 0,05$; Tabela 2 e Figura 2). O touro Fritz apresentou uma concentração espermática média, após a capacitação, significativamente superior à dos restantes touros (573.615 spz/ml; $P < 0,03$). Não houve correlação significativa entre a concentração espermática e a taxa de fertilização *in vitro* ($r = 0,44$; $P > 0,05$).

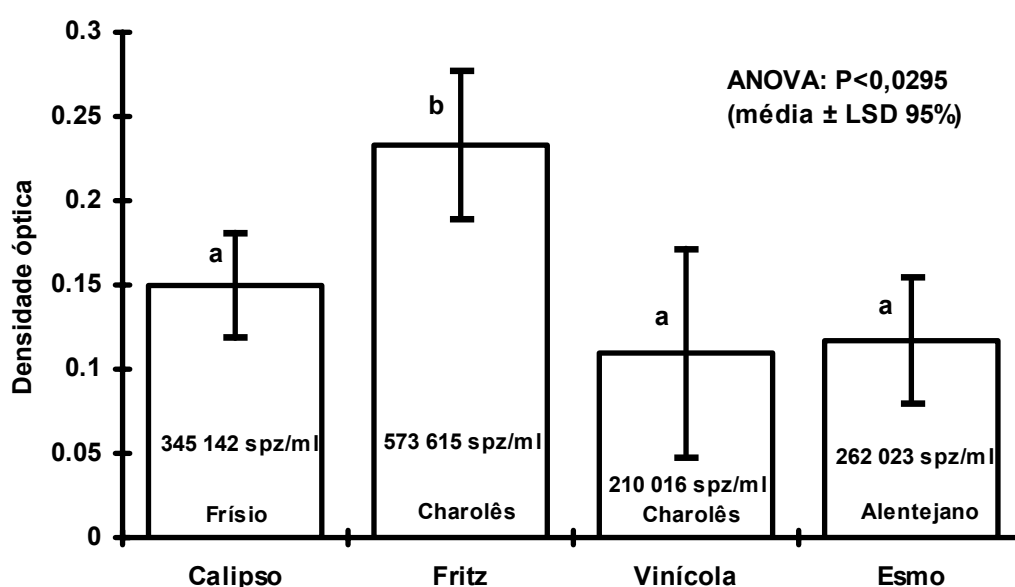


Figura 2 - Concentração de spz avaliada por densidade óptica, após o *swim-up*.

Tabela 2 - Concentração de spz (densidade óptica) após o *swim-up* (Análise de variância e LSD das médias).

Touro	(n)	Média	EP interno	Coef. Var.	LSD das médias (95%)	
Calipso	35	0,1497 a	0,0238	0,94	0,1183	0,1812
Esmo	25	0,1169 a	0,0291	1,25	0,0797	0,1542
Fritz	18	0,2330 b	0,0281	0,51	0,1891	0,2768
Vinicola	9	0,1096 a	0,0202	0,55	0,0476	0,1717
Total	87	0,1534	0,0142	0,89	0,1334	0,1733

Médias com sobrescritos diferentes apresentam diferenças significativas ($P < 0,0295$)

As taxas de sobrevivência dos embriões em co-cultura relativamente a cada um dos grupos estudados, entre as 48 horas e os 8 dias pós-fertilização, são apresentadas na Tabela 3. Os embriões fertilizados pelo touro Fritz apresentaram uma taxa de sobrevivência significativamente superior à dos outros três animais (0,32 vs 0,16, 0,17 e 0,16, respectivamente com os touros Calipso, Esmo e Vinícola; $P < 0,0007$).

Tabela 3 - Taxa de sobrevivência dos embriões em co-cultura entre as 48h e os 8 dias de vida, após fertilização com sêmen de diferentes touros (Análise de variância e LSD das médias).

Touro	(n)	Média	EP interno	Coef. Var.	LSD das médias (95%)	
Calipso	58	0,1643 a	0,0242	1,12	0,1349	0,1936
Esmo	33	0,1707 a	0,0191	0,64	0,1318	0,2096
Fritz	22	0,3262 b	0,0346	0,50	0,2785	0,3739
Vinicola	9	0,1585 a	0,0449	0,85	0,0839	0,2330
Total	122	0,1948	0,0145	0,87	0,1745	0,2150

Médias com sobrescritos diferentes apresentam diferenças significativas ($P < 0,0007$)

Verificou-se existir uma correlação positiva e significativa entre a concentração espermática após a capacitação e a taxa de sobrevivência dos embriões ($r=0,95$; $P < 0,05$), em que os embriões fertilizados pelos espermatozóides oriundos de touros com menores concentrações espermáticas após a capacitação, apresentaram menor capacidade de sobrevivência entre a clivagem e os 8 dias de idade.

Não houve correlação significativa entre a taxa de fertilização e a taxa de sobrevivência dos embriões ($r=0,56$; $P > 0,05$)

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Os resultados apresentados, tal como os de outros autores (Hillery *et al.*, 1990; Shi *et al.*, 1990; Bárándi *et al.*, 1993; Saacke *et al.*, 1994), confirmam que o factor touro se reveste de importância determinante quer ao nível da capacidade de fertilização (número de embriões clivados), quer ao nível da capacidade de crescimento dos embriões clivados até à fase de mórula ou jovem blastocito.

Alguns autores referem a existência de variações atribuídas à utilização de diferentes lotes do mesmo touro (Otoi *et al.*, 1993; Lonergan, 1994). Neste trabalho, este aspecto foi confirmado num dos touros em que se utilizaram dois lotes diferentes.

Neste trabalho como em anteriores (Lonergan, 1994), verificou-se que não existe correlação entre a taxa de fertilização e a taxa de sobrevivência dos embriões.

Não se detectou neste trabalho nenhuma relação entre a concentração dos espermatozoides e a taxa de fertilização sugerindo que as concentrações espermáticas obtidas no final do processo de *swim-up* não constituíram factor limitante à fertilização *in vitro*. Ling e Lu (1990), utilizando diferentes concentrações de sémen, verificaram que a partir de uma concentração espermática superior a $1,6 \times 10^6$ spz/ml a taxa de fertilização diminui. No nosso trabalho nunca se obtiveram concentrações tão elevadas após o *swim-up*. No entanto, a taxa de desenvolvimento dos embriões fecundados até à fase de mórula/jovem blastocito esteve positiva e significativamente correlacionada com a concentração espermática obtida após o *swim-up*. Em estudos de fertilização *in vivo* através da inseminação artificial de vacas superovuladas, DeJarnette *et al.* (1992) verificaram que quanto maior for o número de espermatozoides acessórios competindo simultaneamente para a fertilização dos oócitos, maior é a taxa de viabilidade e qualidade dos embriões obtidos. Estes autores verificaram igualmente que aumentando a concentração espermática, aumenta o número de espermatozoides acessórios, o que sendo transposto para a fertilização *in vitro* explicaria os resultados obtidos neste trabalho.

BIBLIOGRAFIA

- BÁRÁNDI, Z.S., SOLTI, L., CSEH, S., VARGA, Z.S., MACHATY, Z. e VAJTA, G., 1993. Comparison of the *in vitro* fertilizing ability of sperm from endangered Hungarian Grey bulls. *Anim. Reprod. Sci.* 31: 13-19
- DeJARNETTE, J.M., SAACKE, R.G., BAME, J. e VOGLER, C.J., 1992. Accessory sperm: Their importance to fertility and embryo quality and attempts to alter their numbers in artificial inseminated cattle. *J. Anim. Sci.*, 70: 484-491
- HILLERY, F.L., PARRISH, J.J. e FIRST, N.L., 1990. Bull specific effect on fertilization and embryonic development *in vitro*. *Theriogenology*, 33: 249
- LING, Z.J. e LU, K.H., 1990. Frequency of cleavage and development of *in vitro* bovine oocytes fertilized in different numbers in drops with different sperm concentrations. *Theriogenology* 33: 275.
- LONERGAN, P., 1994. The application of *in vitro* fertilization techniques to the prediction of bull fertility, *Reprod. Dom. Anim.* 29: 12-21
- LU, K.H., GORDON, I., CHEN, H.B. e MCGORVEN, H., 1987. *In vitro* culture of early bovine embryos derived from *in vitro* fertilization of follicular oocytes matured *in vitro*. In: *Proc. 3rd Scientific Meeting European Embryo Transfer Association (Lyon)*: 70.
- OTOI, T., TACHIKAWA, S., KONDO, S. e SUZUKI, T., 1993. Effects of different lots of semen from de same bull on *in vitro* development of bovine oocytes fertilized *in vitro*. *Theriogenology*, 39: 713-718
- SAACKE, R.G., NADIR, S. e NEBEL, R.L., 1994. Relationship of semen quality to sperm transport, fertility and embryo quality in ruminants. *Theriogenology*, 41: 45-50

SHI, D.S., LU, K.H. e GORDON I., 1990. Effects of bulls on fertilization on bovine oocytes and their subsequent development in vitro. *Theriogenology*, 3: 324

STATGRAPHICS, 1986. In: User's Guide. Statistical Graphics System, Ed. by Statistical Graphics Corporation, Copyright 1986 STSC. Inc., ISBN 0-926683-06-3.