

## Efeito de concentração espermática e período de incubação oócito-espermatozóides na fecundação *in vitro* em bovinos da raça Gir<sup>(1)</sup>

Luiz Sérgio de Almeida Camargo<sup>(2)</sup>, Wanderlei Ferreira de Sá<sup>(2)</sup>, Ademir de Moraes Ferreira<sup>(2)</sup>, João Henrique Moreira Viana<sup>(3)</sup> e Manoel Carlos Couto Araújo<sup>(3)</sup>

Resumo – Avaliou-se o efeito de concentrações espermáticas e períodos de incubação na fecundação *in vitro* com sêmen de touros Gir (*Bos indicus*). Oócitos maturados *in vitro* foram fecundados com sêmen de dois touros, nas concentrações de 1, 2 ou  $4 \times 10^6$  espermatozóides/mL, por 12 ou 18 horas, e avaliada a taxa de fecundação e polispermia. Posteriormente, foi avaliada a taxa de clivagem com 72 horas e de blastocisto no oitavo dia pós-fecundação. Um segundo experimento verificou o efeito de 1, 2 e  $4 \times 10^6$  espermatozóides/mL por 18 horas, utilizando sêmen de três touros separadamente, bem como o efeito de 12 e 18 horas de incubação, na concentração de 1 a  $2 \times 10^6$  espermatozóides/mL. Observou-se maior ( $P < 0,05$ ) polispermia na concentração de  $4 \times 10^6$  espermatozóides/mL e que a associação dessa concentração com 18 horas aumentou a taxa de clivagem ( $P < 0,05$ ). No segundo experimento, o aumento do período de incubação melhorou ( $P < 0,05$ ) a taxa de clivagem para um dos touros e, quando comparados entre si, os animais produziram taxa de clivagem e de blastocistos diferentes ( $P < 0,05$ ) em uma mesma concentração ou período de incubação. Os resultados revelaram que a polispermia é o principal efeito do aumento da concentração espermática e que a eficiência entre touros na fecundação *in vitro* é dependente da concentração e período de incubação.

Termos para indexação: gado zebu, sêmen, fertilidade, reprodução.

### Effect of sperm concentration and incubation period of oocyte-spermatozoa on *in vitro* fertilization in the Gir breed

Abstract – This research evaluated the effect of sperm concentrations and incubation periods among oocyte-spermatozoa on *in vitro* fertilization with semen of Gir bulls (*Bos indicus*). *In vitro* matured oocytes were fertilized with sperm of two bulls, on concentrations of 1, 2 or  $4 \times 10^6$  spermatozoa/mL during 12 or 18 hours of incubation, and evaluated the fertilization and polyspermy rate as well as cleavage on 72 hours and blastocyst on eighth day post-fertilization. A second experiment evaluated the effect of concentrations of 1, 2 or  $4 \times 10^6$  spermatozoa/mL for 18 hours using sperm of three bulls individually, as well as the effect of 12 and 18 hours of incubation in a concentration of 1 to  $2 \times 10^6$  spermatozoa/mL. It was observed an increase ( $P < 0,05$ ) on polyspermy when the concentration was  $4 \times 10^6$  spermatozoa/mL and that the association of this concentration with 18 hours increased ( $P < 0,05$ ) cleavage rate. The second experiment verified that the increase of incubation period improved ( $P < 0,05$ ) cleavage rate of one bull, and that when compared among themselves the bulls sperm resulted in different ( $P < 0,05$ ) cleavage and blastocyst rate in the same concentration or incubation period. The results showed that polyspermy is the main effect of sperm concentration increase and that the efficiency among bulls on *in vitro* fertilization is dependent on concentration and incubation period.

Index terms: zebu cattle, semen, fertility, reproduction.

<sup>(1)</sup> Aceito para publicação em 3 de agosto de 2001.

Parcialmente financiado pela Fapemig.

<sup>(2)</sup> Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite, Rua Eugênio do Nascimento, 610, CEP 36036-330 Juiz de Fora, MG. E-mail: camargo@cnppl.embrapa.br, wandefsa@cnppl.embrapa.br, ademirmf@cnppl.embrapa.br

<sup>(3)</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Av. Antônio Carlos, 6627, CEP 30123-970 Belo Horizonte, MG. E-mail: vianajhm@cnppl.embrapa.br, manuocouto@hotmail.com

### Introdução

As principais características do gado zebu (*Bos indicus*) são o alto grau de tolerância ao calor, o baixo requerimento nutricional e a resistência a carrapatos, bem como a doenças transmitidas por esses, o que confere aos animais dessas raças aptidão para a sobrevivência em condições tropicais. Embora possuam menor potencial do que as raças

européias, algumas raças zebuínas, particularmente a Gir, têm sido exploradas para a produção de leite no Brasil (Penna & Peixoto, 1998).

Em virtude das características do gado Gir, a multiplicação dos animais de maior produção de leite e a produção de F<sub>1</sub> em escala são necessárias para o aumento da produção leiteira a baixo custo em países das regiões tropicais e subtropicais, e a produção *in vitro* de embriões (PIV) é uma das técnicas mais eficazes de reprodução para tais propósitos. Essa técnica se destaca pelo potencial de multiplicação (Cunningham, 1998), podendo incrementar o melhoramento genético. Embora a PIV venha sendo utilizada em raças européias, com gado zebu foram realizados poucos trabalhos, como por exemplo, com as raças Brahman (Rocha et al., 1998), Guzerá (Camargo et al., 2000) e Nelore (Watanabe et al., 1999).

Na PIV é essencial um sistema de fecundação *in vitro* eficiente, no qual a concentração espermática e o tempo de incubação de oócitos e espermatozoides são fatores importantes para o sucesso dessa tecnologia. A concentração espermática tem afetado a taxa de fecundação e de clivagem em bovinos (Saeki et al., 1995). Tanto o excesso de espermatozoides durante a fecundação como o aumento do tempo de incubação entre os gametas podem provocar aumento da incidência de polispermia (Long et al., 1994). Período prolongado de incubação oócito-espermatozoides pode ter efeitos prejudiciais no desenvolvimento embrionário (Gianaroli et al., 1996), os quais podem diferir entre raças bovinas (Sumantri et al., 1997). Tem-se verificado grande variabilidade entre touros durante a fecundação *in vitro* (Kreysing et al., 1997). Com relação ao gado Gir, Freitas et al. (1997) observaram em programa de transferência de embriões alta taxa de estruturas não fertilizadas e baixa taxa de embriões viáveis, apesar de encontrarem resposta superovulatória satisfatória em mais de 112 coletas, e que poderia ser um indicativo de alguma alteração na fecundação. Como têm havido diferenças de fertilidade entre raças bovinas em sistemas de produção *in vitro* de embriões (Sumantri et al., 1997), torna-se necessário avaliar os efeitos do sêmen de touros Gir na fecundação com uso dessa técnica.

O objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos de diferentes concentrações espermáticas e tempo de incubação oócito-espermatozóide na fecundação *in vitro* e no desenvolvimento embrionário, utilizando sêmen de touros da raça Gir.

### Material e Métodos

Oócitos com células do *cumulus oophorus* (COC) foram aspirados de ovários de fêmeas bovinas mestiças, coletados em matadouro. Os ovários foram transportados para o Laboratório de Reprodução da Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite, em Juiz de Fora, Mg, em frascos com solução fisiológica (0,9% NaCl) contendo antibiótico, à temperatura entre 30 e 35°C, em período de até quatro horas após a coleta.

Os folículos com diâmetro superior a 1,5 mm foram puncionados com uma seringa de 10 mL e agulha de 21 G. Os COCs, com, no mínimo, três camadas de células do *cumulus* e citoplasma homogêneo, foram lavados quatro vezes em Talp Hepes (Bavister et al., 1983) e levados para a maturação *in vitro* em meio TCM 199 (Sigma, St. Louis, MO, USA) acrescido de 10% de soro de vaca em cio (SVC) e 20 µg/mL de FSH (Sigma, St. Louis, MO, USA), durante 24 horas em estufa incubadora com 5% de CO<sub>2</sub> e 38,5°C.

O sêmen utilizado para as fecundações *in vitro* foram de touros da raça Gir participantes do teste de progênie do Programa Nacional de Melhoramento do Gir Leiteiro, cuja motilidade e vigor pós-descongelamento encontravam-se igual ou superior a 65% e 3,5%, respectivamente. O sêmen foi descongelado e os espermatozoides obtidos através da técnica de *swin up* foram centrifugados uma vez a 500 g durante 10 minutos e ressuspendidos em meio de fecundação modificado (Gordon, 1994) acrescido de 10 µg/mL de heparina e 0,6% de BSA. Em seguida, os espermatozoides foram distribuídos em gotas de fecundação (100 a 130 µL) sob óleo mineral, de acordo com a concentração desejada, permanecendo em cultivo com os COCs pelo período determinado no delineamento experimental. A fecundação foi realizada em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> e 38,8°C. Ao final do período de fecundação, os oócitos foram lavados em Talp Hepes e cultivados durante oito dias em 50 µL do meio CR2aa (Rosenkranks & First, 1994) em co-cultura com células da granulosa (10 a 15 oócitos/gota de cultivo), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), no mesmo ambiente atmosférico da fecundação *in vitro*. A taxa de clivagem e de blastocisto foi avaliada com 72 horas e oito dias pós-fecundação, respectivamente. O meio de cultivo foi renovado a cada 48 horas.

Na obtenção das células da granulosa utilizaram-se ovários bovinos obtidos em matadouro, transportados nas

mesmas condições quando da obtenção dos COCs. No laboratório, o líquido folicular de folículos entre 8 e 12 mm de diâmetro foi aspirado e desprezado, e o folículo lavado em Talp Hapes por três vezes para a remoção das células situadas em sua parede. Após esse procedimento, o conteúdo obtido foi lavado mais quatro vezes da mesma forma, antes de ir para o cultivo em CR2aa. As células da granulosa foram cultivadas durante dois dias em incubadora de CO<sub>2</sub>, antes de receber os oócitos recém-fecundados.

### Delineamento experimental

Experimento 1: Os efeitos da concentração espermática sobre a fecundação *in vitro* foram avaliados utilizando-se sêmen de dois touros em conjunto (*pool*), durante dois períodos de incubação. Os COCs maturados foram divididos em três grupos com concentração espermática de 1x10<sup>6</sup>, 2x10<sup>6</sup> e 4x10<sup>6</sup> células móveis/mL. Em cada grupo os espermatozoides permaneceram 12 ou 18 horas com os oócitos, durante a fecundação *in vitro*. O experimento foi dividido em duas fases. Na primeira, os oócitos (n = 357 em quatro repetições) foram fixados em solução metanol:ácido acético (3:1) logo após o término do período de fecundação, e corados com 1% de orceína (Sigma, St. Louis, MO, USA) em ácido acético. Considerou-se fecundação quando os oócitos apresentavam dois pronúcleos ou a presença da cabeça/cauda do espermatozoide no citoplasma. Oócitos com dois pronúcleos e a cabeça/cauda de um espermatozoide ou mais de dois pronúcleos foram considerados poliespermáticos. Na segunda fase, os zigotos (n = 551 em seis repetições) foram cultivados durante oito dias para avaliação da taxa de clivagem e produção de embriões.

Experimento 2: Espermatozoides de três touros foram utilizados para avaliar os efeitos de diferentes concentrações espermáticas ou períodos de incubação para cada touro, durante a fecundação *in vitro*. Primeiramente, avaliou-se o efeito das concentrações de 1x10<sup>6</sup>, 2x10<sup>6</sup> ou 4x10<sup>6</sup> espermatozoides móveis/mL durante 18 horas (n=878 oócitos, três repetições). Em uma segunda etapa, avaliou-se o efeito dos períodos de incubação de 12 ou 18 horas, utilizando-se uma concentração de 1x10<sup>6</sup> a 2x10<sup>6</sup> espermatozoides móveis/mL (n = 573 oócitos, três repetições). Nas duas etapas os zigotos foram cultivados por oito dias para avaliação da taxa de clivagem e produção de embriões.

Os resultados totais de todas as repetições foram analisados pelo teste exato de Fisher ou pelo teste do qui-quadrado. Considerou-se nível de significância de P<0,05. Os valores são apresentados em porcentagem e erro médio padrão (EM) entre as repetições.

### Resultados e Discussão

Não houve efeito significativo da concentração espermática na taxa de fecundação e poliespermia durante a fecundação *in vitro* realizada com 12 ou 18 horas. O período de incubação também não influenciou a fecundação e a poliespermia, dentro de uma mesma concentração espermática (Tabela 1). Como as concentrações espermáticas comparadas dentro de um mesmo período de incubação não alteraram a taxa de fecundação e poliespermia, os resultados com 12 e 18 horas de incubação foram totalizados para se avaliar o efeito da concentração

**Tabela 1.** Efeito da concentração espermática sobre a fecundação (% ± erro médio padrão) *in vitro*, realizada em períodos de 12 e 18 horas de incubação oócito-espermatozoides, utilizando-se sêmen de touros da raça Gir.

Concentração espermática/mL	Oócitos fecundados			Oócitos com poliespermia		
	12 horas	18 horas	Total	12 horas	18 horas	Total <sup>(1)</sup>
1x10 <sup>6</sup>	55,8±15,2 (29/52)	63,8±5,6 (44/69)	60,3±6,9 (73/121)	1,9±1,21 (1/52)	2,9±1,3 (2/69)	2,5±0,9a (3/121)
2x10 <sup>6</sup>	58,4±5,9 (38/65)	66,1±5,5 (43/65)	62,3±5,5 (81/130)	3,1±1,35 (2/65)	4,6±4,7 (3/65)	3,8±2,37ab (5/130)
4x10 <sup>6</sup>	66,0±9,2 (35/53)	64,1±4,1 (34/53)	65,1±4,8 (69/106)	9,4±7,3 (5/53)	7,5±3,0 (4/53)	8,5±3,7b (9/106)
Total	60,0±5,6 (102/170)	64,7±3,4 (121/187)		4,7±2,9 (8/170)	4,8±1,9 (9/187)	

<sup>(1)</sup>Valores com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si pelo teste exato de Fisher (P<0,05); valores entre parênteses significam número de oócitos fecundados ou com poliespermia em relação ao total de oócitos.

independentemente do período de incubação. Os resultados das concentrações espermáticas também foram totalizados para se avaliar o efeito do período de incubação independentemente da concentração utilizada (Tabela 1). Portanto, o período de incubação continuou sem efeito sobre a fecundação e polispermia. Entretanto, o aumento da concentração de  $1 \times 10^6$  para  $4 \times 10^6$  espermatozoides/mL aumentou ( $P < 0,05$ ) a taxa de polispermia (2,5% e 8,5%, respectivamente), sem afetar a taxa de fecundação. Os efeitos do aumento da concentração espermática sobre a polispermia parecem ser comuns durante a fecundação *in vitro* (Long et al., 1994; Saeki et al., 1995). Um dos resultados da polispermia é a produção de embriões triplóides, encontrados principalmente em embriões de duas a oito células e que normalmente não atingem estágio de blastocisto (Galli & Lazzari, 1996). Portanto, a manutenção da polispermia em níveis baixos é uma preocupação em sistemas de fecundação *in vitro*. Como observado no presente trabalho, pode-se diminuir a incidência da polispermia diminuindo a concentração espermática, sem afetar a taxa de fecundação normal. Além de diminuir a polispermia, o ajuste da concentração espermática também pode ser útil em reduzir a exposição dos oócitos a produtos metabólicos ou degenerativos eliminados pelos espermatozoides (Gianaroli et al., 1996) e que possam prejudicar o desenvolvimento do oócito ou induzir a partenogênese.

As concentrações espermáticas utilizadas não afetaram a taxa de clivagem e blastocistos (Tabela 2). Watanabe et al. (1996) também não constataram diferença entre  $2 \times 10^6$  e  $4 \times 10^6$  espermatozoides/mL com

sêmen de touros Nelore. Entretanto, o aumento do período de incubação de 12 para 18 horas resultou em maior ( $P < 0,05$ ) taxa de clivagem (51,1% e 75,2%, respectivamente) somente na concentração de  $4 \times 10^6$  espermatozoides/mL, mostrando que o efeito do período de incubação sobre a clivagem depende de uma concentração espermática mais elevada. O aumento encontrado não foi precedido de maior polispermia ou fecundação do oócito (Tabela 1) ou resultou em maior taxa de produção de blastocistos (Tabela 2). Tal fato pode significar que o aumento da taxa de clivagem pode ter origem em alguma condição anormal durante o cultivo de fecundação, provocada pelo aumento do período de incubação associado a uma concentração espermática mais elevada. Uma das anormalidades descritas como de ocorrência comum durante a fecundação *in vitro* é a partenogênese, em que oócitos partenogênicos raramente se dividem mais que duas vezes (Gordon, 1994), podendo, assim, interferir principalmente na taxa de clivagem, sem alterar a produção de embriões. A partenogênese pode surgir em decorrência de componentes químicos presentes no meio de cultivo (Ayoub & Hunter, 1993), bem como ser induzida por determinadas enzimas, como a hialuronidase (Henery & Kaufman, 1993), presentes no acrossoma de espermatozoides. Jurisicova et al. (1995) postulam que a prolongada exposição a um grande número de espermatozoides pode expor os oócitos a enzimas e outros fatores liberados durante a reação acrossômica, provocando aumento de fragmentação dos zigotos. Essas estruturas fragmentadas raramente chegam a estágio de blastocisto e normalmente possuem alta incidência de anomalias citogenéticas.

**Tabela 2.** Efeito da concentração espermática sobre a clivagem e produção de blastocistos (%  $\pm$  erro médio padrão) durante a fecundação *in vitro* com sêmen de touros da raça Gir, realizada em períodos de 12 e 18 horas de incubação oócito-espermatozoides<sup>(1)</sup>.

Concentração espermática/mL	Clivagem		Blastocistos	
	12 horas	18 horas	12 horas	18 horas
$1 \times 10^6$	62,5 $\pm$ 6,0 (60/96)	68,2 $\pm$ 6,9 (58/85)	20,8 $\pm$ 4,6 (20/96)	23,5 $\pm$ 5,0 (20/85)
$2 \times 10^6$	62,9 $\pm$ 7,8 (56/89)	71,2 $\pm$ 5,1 (67/94)	21,4 $\pm$ 5,6 (19/89)	18,1 $\pm$ 5,2 (17/94)
$4 \times 10^6$	51,1 $\pm$ 4,12 (46/90)a	75,2 $\pm$ 3,4 (73/97)b	20,0 $\pm$ 5,3 (18/90)	24,8 $\pm$ 6,3 (24/97)

<sup>(1)</sup>Valores com letras diferentes na mesma linha diferem significativamente entre si pelo teste do qui-quadrado ( $P < 0,05$ ); valores entre parênteses significam número de clivados ou de blastocistos em relação ao total de oócitos.

A taxa de blastocistos não foi afetada pela concentração espermática ou período de incubação (Tabela 2). Embora tenha sido reportado aumento da taxa de blastocisto quando se aumenta a concentração espermática (Long et al., 1994), no presente trabalho não houve efeito do aumento da concentração espermática sobre a produção de blastocistos, corroborando outros trabalhos com bovinos (Dias, 2000).

Não houve efeito da concentração espermática sobre a taxa de clivagem ou de blastocistos para cada touro (Tabela 3). Entretanto, dentro de uma mesma concentração espermática, a taxa de clivagem e blastocistos foi diferente entre touros. Nas concentrações de  $1 \times 10^6$  e  $2 \times 10^6$  espermatozoides/mL, o touro A produziu taxa de clivagem maior do que o touro C (67,0% e 52,3% para  $1 \times 10^6$  espermatozoides e 72,9% e 51% para  $2 \times 10^6$  espermatozoides, respectivamente;  $P < 0,05$ ), porém essa taxa foi semelhante nos três touros na concentração de  $4 \times 10^6$  espermatozoides/mL, mostrando que o aumento da concentração espermática diminuiu a diferença entre o touro A e C. Da mesma forma, a taxa de blastocistos do touro B foi maior do que a do touro C (26,0% e 14,9%, respectivamente;  $P < 0,05$ ) na concentração de  $1 \times 10^6$  espermatozoides/mL, mas semelhante nas concentrações maiores.

Houve efeito do período de incubação sobre a taxa de clivagem somente em relação ao touro B (54,6% e 71,6% em 12 e 18 horas, respectivamente;  $P < 0,05$ ). Diferenças na taxa de clivagem também foram observadas entre os touros quando comparados dentro de um mesmo período de incubação. A taxa de clivagem do touro A foi superior ( $P < 0,05$ ) ao dos touros B e C durante as 12 horas de incubação (79,5%, 54,6% e 44,9%, respectivamente), porém quando a fecundação foi realizada durante 18 horas, o touro B aumentou a taxa de clivagem, sendo semelhante ao touro A (71,6% e 67,9%, respectivamente). O mesmo ocorreu com a taxa de blastocisto, a qual, com 12 horas de incubação, foi igual entre os touros. Com 18 horas de incubação, o touro B produziu maior taxa do que o touro C (25,2% e 10,9%, respectivamente;  $P < 0,05$ ).

O presente estudo mostrou efeito do período de incubação sobre a taxa de clivagem na raça Gir, quando se utilizou um *pool* de espermatozoides de dois touros e em concentração espermática elevada (Tabela 2), porém, quando analisado em três diferentes touros, o período de incubação surtiu efeito em apenas um deles (Tabela 3), demonstrando não haver efeito generalizado do período de incubação sobre a taxa de clivagem, mas que a mesma é dependente, além da concentração espermática, também do touro

**Tabela 3.** Efeito da concentração espermática e do período de incubação sobre a taxa de clivagem e produção de blastocistos (%  $\pm$  erro médio padrão) com sêmen de touros diferentes (A, B e C)<sup>(1)</sup>.

Concentração espermática/mL	Clivagem			Blastocistos		
	A	B	C	A	B	C
$1 \times 10^6$	67,0 $\pm$ 7,4a (57/85)	63,5 $\pm$ 5,4ab (61/96)	52,3 $\pm$ 7,5b (56/107)	18,8 $\pm$ 4,7ab (16/85)	26,0 $\pm$ 4,3a (25/96)	14,9 $\pm$ 3,4b (16/107)
$2 \times 10^6$	72,9 $\pm$ 5,0a (62/85)	62,2 $\pm$ 7,6ab (61/98)	51,0 $\pm$ 3,0b (56/110)	18,8 $\pm$ 5,3 (16/85)	20,4 $\pm$ 5,7 (20/98)	13,3 $\pm$ 5,0 (15/110)
$4 \times 10^6$	62,6 $\pm$ 7,5 (57/91)	64,6 $\pm$ 5,0 (62/96)	53,6 $\pm$ 6,0 (59/110)	17,6 $\pm$ 6,0 (16/91)	27,0 $\pm$ 4,5 (26/96)	21,8 $\pm$ 3,3 (24/110)
Período de incubação						
12 horas	79,5 $\pm$ 6,6a (62/78)	54,6 $\pm$ 4,0bA (54/99)	44,9 $\pm$ 4,1b (48/107)	24,4 $\pm$ 4,4 (19/78)	20,2 $\pm$ 6,0 (20/99)	17,8 $\pm$ 5,6 (19/107)
18 horas	67,9 $\pm$ 5,5a (57/84)	71,6 $\pm$ 6,2aB (68/95)	58,2 $\pm$ 3,0b (64/110)	15,5 $\pm$ 4,5ab (13/84)	25,2 $\pm$ 4,1a (24/95)	10,9 $\pm$ 4,2b (12/110)

<sup>(1)</sup>Valores com letras diferentes, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, diferem entre si significativamente pelo teste do qui-quadrado ( $P < 0,05$ ); valores entre parênteses significam número de clivados ou blastocistos em relação ao total de oócitos.

utilizado. Por sua vez, de maneira semelhante ao ocorrido quando avaliados diferentes touros em uma mesma concentração espermática, verificou-se diferença na taxa de clivagem e de blastocisto entre touros em um mesmo período de incubação. Tal fato indica que o sêmen dos touros comportou-se diferentemente durante a fecundação *in vitro*, demonstrando a necessidade de diferentes concentrações espermáticas para que os touros apresentem resultados semelhantes.

Essas diferenças nas respostas individuais dos touros durante a fecundação *in vitro* em uma mesma concentração espermática ou período de incubação pode ser devido à capacidade intrínseca de cada indivíduo de fertilizar os oócitos, provocada pelas diferenças nas características metabólicas das células espermáticas (Brackett & Oliphant, 1975). As diferenças de fertilidade entre touros podem estar relacionadas à capacidade da membrana espermática em fundir-se com a membrana do oócito, o que pode ser influenciado pela habilidade de o espermatozoide tornar-se capacitado e sofrer a reação acrossômica (Henault & Killian, 1995). A utilização de substâncias capacitadoras, como a heparina, durante a capacitação espermática *in vitro* tem sido importante para se atingir altas taxas de fecundação com essa técnica, podendo haver variações entre a dose necessária para cada touro. No presente experimento procurou-se utilizar 10 µg/mL de heparina citada como inicialmente adequada para sêmen de touros da raça Gir (Lopes, 1999). Por sua vez, a capacidade de cada touro em produzir e secretar complexos de proteínas ligadoras de heparina (HPB), com diferentes afinidades a essa glicosaminoglicana no plasma seminal ou a capacidade de seus espermatozoides de incorporar essas substâncias à membrana plasmática, pode estar relacionada à diferença na capacitação espermática e na fertilidade entre indivíduos (Bellin et al., 1996). É possível que essas diferenças na fecundação *in vitro* entre touros com quantidades diferentes de complexos HPB de alta afinidade à heparina possam ser diminuídas ajustando-se as concentrações espermáticas e período de incubação.

## Conclusões

1. A fecundação *in vitro* com sêmen de touros da raça Gir não deve ser realizada com concentrações maiores do que  $2 \times 10^6$  espermatozoides/mL, para evitar aumento da incidência de polispermia.

2. O aumento da taxa de clivagem está associado à utilização de maior período de incubação, com elevada concentração de células espermáticas durante a fecundação *in vitro* com sêmen de touros da raça Gir.

3. Sêmen de diferentes touros da raça Gir não possuem a mesma eficiência, avaliada pela taxa de clivagem e de blastocistos, quando comparados em uma mesma concentração espermática ou período de incubação durante a fecundação *in vitro*.

4. O aumento da concentração espermática na fecundação *in vitro* diminui a diferença entre touros da raça Gir quanto à taxa de clivagem e de blastocistos.

5. A fecundação *in vitro* com sêmen de touros da raça Gir apresenta resultados satisfatórios.

## Referências

- AYOUB, M. A.; HUNTER, A. G. Parthenogenetic activation of *in vitro* matured bovine oocytes. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 76, p. 421-429, 1993.
- BAVISTER, B. D.; LEIBFRIED, M. L.; LIEBERMAN, G. Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 28, p. 235-243, 1983.
- BELLIN, M. E.; HAWKINS, H. E.; OYARZO, J. N.; VANDERBOOM, R. J.; AX, R. L. Monoclonal antibody detection of heparin binding proteins on sperm corresponds to increase fertility of bulls. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 74, p. 173-182, 1996.
- BRACKETT, B. G.; OLIPHANT, G. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 12, p. 260-274, 1975.
- CAMARGO, L. S. de A.; SÁ, W. F. de; FERREIRA, A. de M.; VIANA, J. H. M.; FREITAS, C. A concentração espermática na fecundação "in vitro", utilizando sêmen de touro Guzerá. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 52, n. 1, p. 59-64, 2000.

- CUNNINGHAM, E. P. The potential of new reproductive and genetic technologies. **Acta Agriculturae Scandinavica Section A, Animal Science**, Copenhagen, v. 29, p. 67-76, 1998. Supplement.
- DIAS, L. P. B. **Fecundação *in vitro* com sêmen de touros da raça Guzerá (*Bos taurus indicus*)**. 2000. 56 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia da Reprodução e Inseminação Artificial) - Faculdade de Veterinária, Universidade Fluminense, Niterói.
- FREITAS, C.; FERREIRA, A. de M.; SÁ, W. F. de.; CAMARGO, L. S. de A.; JUNQUEIRA, M. M. Desempenho de vacas Gir na resposta superovulatória e produção de embriões. **Arquivo da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, Porto Alegre, v. 25, p. 232-233, 1997. Suplemento.
- GALLI, C.; LAZZARI, G. Practical aspects of IVM/IVF in cattle. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 42, p. 371-379, 1996.
- GIANAROLI, L.; MAGLI, M. C.; FERRARETI, A. P.; FIORENTINO, A.; TOSTI, E.; PA, S.; DALE, B. Reducing the time of sperm-oocyte interaction in human *in vitro* fertilization improves the implantation rate. **Human Reproduction**, Oxford, v. 11, p. 166-171, 1996.
- GORDON, I. **Laboratory production of cattle embryos**. Wallingford: CAB International, 1994. 640 p.
- HENAULT, M. A.; KILLIAN, G. J. Effects of sperm preparation and bull fertility on *in vitro* penetration of zone-free bovine oocytes. **Theriogenology**, Stoneham, v. 43, p. 739-749, 1995.
- HENERY, C. C.; KAUFMAN, M. H. The incidence of aneuploidy after single pulse electroactivation of mouse oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 34, p. 299-307, 1993.
- JURISICOVA, A.; VARMUZA, S.; CASPER, R. F. Involvement of programmed cell death in preimplantation embryos demise. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 1, p. 558-566, 1995.
- KREYSING, U.; NAGAI, T.; NIEMANN, H. Male-dependent variability of fertilization and embryo development in two bovine “*in vitro*” fertilization systems and the effects of casein phosphopeptides. **Reproduction, Fertility and Development**, Collingwood, v. 9, p. 465-474, 1997.
- LONG, C. R.; DAMIANI, P.; PINTO-CORREIA, C.; MacLEAN, R. A.; DUBY, R. T.; ROBL, J. M. Morphology and subsequent development “*in vitro*” culture of bovine oocytes matured “*in vitro*” under various conditions of fertilization. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, Inglaterra, v. 102, p. 361-369, 1994.
- LOPES, C. F. **Concentração de heparina na capacitação espermática avaliada pela reação acrossômica em sêmen de bovinos raça Gir**. 1999. 63 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia da Reprodução e Inseminação Artificial) - Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.
- PENNA, V. M.; PEIXOTO, M. G. C. D. Raças zebus para a produção de cruzamento F<sub>1</sub>. **Caderno Técnico da Escola de Veterinária da UFMG**, Belo Horizonte, v. 25, p. 53-64, 1998.
- ROCHA, A.; RANDEL, R. D.; BROUSSARD, J. R.; BLAIR, R. M.; ROUSSEL, J. D.; GODKE, R. A.; HANSEL, W. High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* but not in *Bos indicus* cows. **Theriogenology**, Stoneham, v. 49, p. 657-665, 1998.
- ROSENKRANKS, C. F.; FIRST, N. L. Effect of free amino acids and vitamins on cleavage and developmental rate of bovine zygotes *in vitro*. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 72, p. 434-437, 1994.
- SAEKI, K.; NAGAO, Y.; HOSHI, M.; NAGAI, M. Effects of heparin, sperm concentration and bull variation on *in vitro* fertilization of bovine oocytes in a protein-free medium. **Theriogenology**, Stoneham, v. 43, p. 751-760, 1995.
- SUMANTRI, C.; BOEDIONO, A.; OOE, M.; MURAKAMI, M.; SAHA, S.; SUZUKI, T. The effect of sperm-oocyte incubation time on *in vitro* embryo development using sperm from a tetraparental chimeric bull. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 48, p. 187-195, 1997.
- WATANABE, M. R.; WATANABE, Y. F. de; DAYAN, A.; FRANCESCHINI, P. H.; VILA, R. A.; GALERANI, M. A. V.; LOBO, R. B. Aspiração folicular e fecundação *in vitro* em *Bos indicus*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 23, p. 257-258, 1999.
- WATANABE, Y. F.; AZAMBUJA, R. M.; PERIPATO, A. C.; VILA, R. A.; GALERANI, M. A. V.; LOBO, R. B. Efeito de touros na produção *in vitro* de embriões com diferentes concentrações de heparina e de espermatozoides. **Arquivo da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, Porto Alegre, v. 24, p. 250, 1996. Suplemento.