

IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA DE PATERNIDADE EM SUÍNOS E INTERAÇÃO COM FERTILIDADE *IN VITRO* E *IN VIVO*

TASSI VANZELA¹; MATEUS FLACH², ANDERSON GUARISE³; CARLOS
EDUARDO RANQUETAT⁴; THOMAZ LUCIA Jr.⁵

¹Universidade Federal de Pelotas – tassi166@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas - flachmateus@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas - anderson_guarise@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – c_ranquetat@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – tluciajr@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Em granjas comerciais de suínos, é comum o uso de doses inseminantes heterospérmicas, com o intuito de compensar a subfertilidade do ejaculado de alguns reprodutores, pela combinação com o ejaculado de outros indivíduos (um ou mais) de fertilidade superior (DZIUK, 1996). No entanto, o uso de doses heterospérmicas impede a avaliação da contribuição individual de cada macho em termos da paternidade da progênie produzida (FOXCROFT, 2010). Como consequência, através da IA heterospérmica, ejaculados de machos de maior fertilidade podem mascarar a subfertilidade de outros indivíduos.

O objetivo do trabalho é identificar a contribuição individual de machos suínos para a paternidade de leitegadas produzidas a partir de IA com doses homospermas e heterospérmicas, através de avaliação por marcadores moleculares do tipo SNP (*single nucleotide polymorphisms*).

2. METODOLOGIA

Foram utilizados quatro reprodutores suínos, mantidos em regime de coleta semanal, em uma agroindústria localizada no centro oeste de Santa Catarina. A coleta dos animais foi realizada por funcionários treinados pelo método de mão enluvada (Bearden & Fuquay, 1997). Na central de coleta de sêmen foram analisados os seguintes parâmetros de qualidade seminal: volume, concentração, motilidade, vigor e morfologia espermática segundo recomendações do CBRA (1998). Para formação das doses inseminantes, foram utilizados apenas ejaculados com motilidade igual ou superior a 80%, vigor igual ou superior a três e concentração de três bilhões de espermatozoides.

As doses homospermas eram provenientes de um único macho (A, B, C e D), e as heterospérmicas combinaram ejaculados de pares de reprodutores (AB, AC, AD, BC, BD e DC). Nas doses heterospérmicas, o sêmen diluído foi homogeneizado e quantidades iguais foram medidas em uma proveta de 1000 mL, com graduação. Um total de 500 fêmeas foram inseminadas: 200 fêmeas no grupo homosperma; e 300 grupo heterosperma (50 fêmeas por tipo de dose).

Para a genotipagem e determinação da paternidade, foram coletadas amostras de sangue, durante o parto, da veia marginal da orelha das porcas e do cordão umbilical de cada leitão nascido vivo e natimorto. Amostras de tecidos foram coletadas de todos os fetos mumificados. Para validar os procedimentos experimentais, foram coletadas amostras de 40 porcas submetidas a IA homosperma e de seus leitões. Em outro período, também foram coletadas amostras dos quatro machos utilizados como doadores de sêmen. Todas as amostras foram armazenadas em filtros de papel tratados quimicamente (Whatman FTA cards ® , BioAmerica Inc. , Miami, FL , EUA).

No laboratório, foi realizada a técnica de PCR para a extração do DNA e o DNA foi quantificado por espectrofotometria. Para identificação de paternidade foi utilizado o painel SeekSire® para suínos (GeneSeek, Neogen® Corporation, Lansing, MI, EUA), com amostras de cada indivíduo colocadas em placas de 96 poços, utilizando 96 SNPs (Gabriel, et al, 2009). As amostras de DNA foram genotipadas utilizando a plataforma Iplex MassARRAY® (Sequenom®, San Diego, CA, EUA).

Após a genotipagem, foi avaliado o número de alelos compartilhados por cada locus (IBS) entre cada par de machos, e também para leitões e porcas. Os locos foram categorizados como: IBS2, quando eles compartilharam dois alelos; IBS1, compartilham um alelo; e IBS0, quando não apresentavam nenhum alelo compartilhado (indicando inconsistências mendelianas). O número de loci por categoria foi contado usando o software Plink® (Purcell et al., 2007). As amostras que apresentaram resultados inconclusivos foram genotipados pela segunda vez: quando ambos os machos que contribuíram para a amostra coletiva apresentaram IBS0 igual a três ou inferior; quando todos os supostos pais apresentam IBS0 maior do que três; quando o IBS0 entre a porca e os leitões foi maior do que três; ou quando as tarifas de chamadas (*call rates*) foram inferiores a 75%.

Após a exclusão de paternidade nas leitegadas oriundas de IA heterospérmica, o número total de leitões gerados foi contado e a contribuição da paternidade em porcentagem foi calculada para cada macho em cada amostra de esperma em *pool*. Foi comparado o número médio de leitões gerados através IA heterospérmica por macho pela análise de variância. A contribuição de paternidade percentual média de macho foi calculada e comparada através da análise de Kruskal-Wallis de variância para dados não-paramétricos entre: partos; e os quatro machos incluídos nas doses homospérmicas de sêmen. Todas as análises foram feitas com Statistix® (2008).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi realizada genotipagem em 281 amostras de leitegadas geradas por IA heterospérmica, correspondendo a 3.558 leitões. Apenas 207 (5,8%) apresentaram resultados inconclusivos: quase 70 % destas amostras eram amostras de tecidos de fetos mumificados. A paternidade foi confirmada em todos os 461 leitões das 40 leitegadas geradas através da IA homospérmica.

Com IA heterospérmica, o macho D apresentou maior proporção de paternidade que os demais machos nas doses nas quais foi utilizado ($P < 0,05$), gerando 8,5 leitões por leitegada (mais de dois terços em cada leitegada), nos pares BD e CD (Tabela 1).

O macho B gerou menos leitões que os demais machos em todos os pares ($P < 0,05$). Contribuição semelhante para a paternidade com IA heterospérmica só foi observada para os machos A e C ($P > 0,05$).

Tabela 1. Numero total de leitões gerados por *pool* seminal e por amostras individuais por macho através de IA

^{a,b}Médias \pm EPM letras distintas significam diferença estatística nos *pools* $P < 0.05$.

Pares	Macho	Leitões gerados		
		Total	Por leitegada	(%)
AB	A	356	7.9	60.8 \pm 3.3 ^a
	B	183	4.1	31.3 \pm 3.6 ^b
	Inconclusivo	46	1.0	7.9 \pm 1.7
Total		585	13.0	
AC	A	277	5.6	49.2 \pm 3.6 ^a
	C	258	5.3	45.8 \pm 3.4 ^a
	Inconclusivo	28	0.6	5.0 \pm 2.8
Total		563	11.5	
AD	A	205	4.5	33.8 \pm 3.9 ^b
	D	355	7.7	58.5 \pm 3.8 ^a
	Inconclusivo	47	1.0	7.7 \pm 1.6
Total		607	13.2	
BC	B	252	5.1	40.0 \pm 3.0 ^b
	C	350	7.1	55.5 \pm 3.1 ^a
	Inconclusivo	29	0.6	4.5 \pm 0.7
Total		631	12.9	
BD	B	156	3.5	27.2 \pm 2.5 ^b
	D	384	8.5	66.9 \pm 2.8 ^a
	Inconclusivo	34	0.8	5.8 \pm 4.3
Total		574	12.8	
CD	C	194	4.4	32.4 \pm 2.5 ^a
	D	381	8.7	63.8 \pm 2.8 ^b
	Inconclusivo	23	0.5	3.8 \pm 2.1
Total		598	13.6	

Quanto a avaliação de paternidade, este é o primeiro estudo que comparou IA homospérmica e heterospérmica em suínos em condições de rotina da granja, considerando tanto o desempenho reprodutivo como determinação de paternidade usando SNPs. Existe estudo anterior em relação a paternidade entre os mesmos métodos de IA utilizando microssatélites, porém com apenas dois machos, caracterizando uma amostra experimental menor (Stahlberg et al, 2000).

Como o macho B apresentou a menor contribuição para a paternidade nos pares para os quais contribuiu, os resultados do presente estudo contradizem os pressupostos de que a IA heterospérmica compensa a menor fertilidade de um

determinado macho através de uma maior fertilidade do outro (Dziuk , 1996; Foxcroft et al , 2010). Apesar de todos os pares apresentarem um desempenho satisfatório com IA heterospermica, a genotipagem revelou que o macho B contribuiu para 40% dos leitões. Assim, o macho B poderia ser considerado sub-fértil em comparação com os outros três machos avaliados neste estudo, fato este que permaneceria oculto através do uso de IA heterospermica (Ruiz- Sanchez et al, 2006; Foxcroft et al, 2008).

4. CONCLUSÕES

A genotipagem com marcadores SNP permitiu a determinação de paternidade em mais de 94% dos leitões gerados através de IA heterospermica. O macho D contribuiu para a paternidade de mais de dois terços dos leitões nascidos nos pares nos quais contribuiu para IA heterospermica, enquanto que o macho B foi o que apresentou menor contribuição.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEARDEN, H.J.; FUQUAY, J.W. Semen evaluation. In: BEARDEN, H.J.; FUQUAY, J.W. (Ed). **Applied Animal Reproduction**. 4th ed. Ed. Prentice Hall, New Jersey, NJ, EUA, p. 677-689. 1997
- CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, CBRA, Belo Horizonte-MG. 49 p. 1998.
- DZIUK, P.J. Factors that influence the proportion of offspring sired by a male following heterospermic insemination. **Animal Reproduction Science**. v. 43, p. 65-88; 1996.
- FOXCROFT, G.; PATTERSON, J.; DYCK M. Improving production efficiency in a competitive industry. In **Manitoba Swine Seminar**. p. 81-98, Winnipeg, Canada 2010.
- FOXCROFT, G.; PATTERSON, J.; DYCK M. Improving production efficiency in a competitive industry. In **Manitoba Swine Seminar**. p. 81-98, Winnipeg, Canada 2010.
- GABRIEL, S.; ZIAUGRA, L.; TABBAA, D. SNP genotyping using the Sequenom MassARRAY iPLEX platform. **Current Protocols in Human Genetics**, v. 60, 2009.
- PURCELL, S.; NEALE, B.; TODD-BROWN, K. et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. **The American Journal of Human Genetics**, v. 81, p. 559 – 575, 2007.
- RUIZ-SANCHEZ, A.L.; O'DONOGHUE, R.; NOVAK, S. et al. The predictive value of routine semen evaluation and IVF technology for determining relative boar fertility. **Theriogenology**, v. 66, p. 736–748, 2006.
- STAHLBERG, R; HARHZIUS, B.; WEITZE, K.F.; WABERSKI, D. Identification of embryo paternity using polymorphic DNA markers to assess fertilizing capacity of spermatozoa after heterospermic insemination in boars. **Theriogenology**, v. 53, p. 1365-1373, 2000.