

**ASPECTOS RELACIONADOS À OCORRÊNCIA DA POLISPERMIA
DURANTE A FERTILIZAÇÃO *IN VITRO* (FIV) EM SUÍNOS
ASPECTS RELATING TO THE POLYSPERMY OCCURRENCE DURING *IN
VITRO* FERTILIZATION (FIV) IN PIGS**

Guilherme OBERLENDER

Médico Veterinário, Doutorando em Zootecnia (DZO), Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, Minas Gerais. E-mail: guilherme_oberlender@yahoo.com.br

Luis David Solis MURGAS

Médico Veterinário, DSc. Professor Associado do Departamento de Medicina Veterinária (DMV), Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, Minas Gerais. E-mail: lsmurgas@dmv.ufla.br

Márcio Gilberto ZANGERONIMO

Médico Veterinário, DSc. Professor Adjunto do Departamento de Medicina Veterinária (DMV), Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, Minas Gerais. E-mail: zangeronimo@dmv.ufla.br

Adriana Cristina da SILVA

Médica Veterinária, MSc. Doutoranda em Ciências Veterinárias (DMV), Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, Minas Gerais. E-mail: adrianagudi@gmail.com

Tila de Alcantara MENEZES

Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária (DMV), Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, Minas Gerais. E-mail: tilamenezes@yahoo.com.br

Thais Preisser PONTELO

Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária (DMV), Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, Minas Gerais. E-mail: thaispreisser@yahoo.com.br

Luciano José PEREIRA

Odontólogo, DSc. Professor Adjunto do Departamento de Medicina Veterinária (DMV), Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, Minas Gerais. E-mail: lucianojosepereira@dmv.ufla.br

RESUMO

A polispermia é o fenômeno patológico mais comum observado durante a fertilização de ovócitos, sendo que na espécie suína esta apresenta maior incidência, tanto *in vivo* quanto *in vitro*. A fertilização *in vitro* é uma técnica que permite o estudo dos mecanismos pelos quais os ovócitos bloqueiam a polispermia, fato de grande importância, uma vez que em suínos, sua ocorrência supera 50% do total de ovócitos penetrados. *In vitro* a polispermia se deve a inúmeros fatores, sendo que dentre esses, são indicados, a fertilização de ovócitos imaduros e/ou velhos, a alta concentração de espermatozoides capacitados utilizados, a ocorrência de falhas no processo de reação da zona pelúcida após a penetração espermática e falhas na liberação dos grânulos corticais. Por outro lado, estudos *in vitro* têm avaliado o papel das células e secreções do oviduto e também do fluido folicular pré-ovulatório em bloquear a polispermia em suínos. Além também da adição de inúmeras moléculas aos meios de cultivo na tentativa de se diminuir os elevados índices de penetração polispérmica durante a realização da técnica de fertilização. Outros fatores de relevada importância nas taxas de penetração polispérmica são o controle do pH e dos níveis de cálcio dos meios utilizados, a utilização de elevadas temperaturas durante a fertilização e também a permanência de elevadas concentrações de íons potássio, muito importantes para um adequado processo de hipermotilidade, capacitação e reação acrossômica. Assim, condições subótimas nestas características também induzem a um aumento das taxas de

fertilização polispérmica. Portanto, o principal problema da fertilização *in vitro* é a alta incidência de polispermia e conseqüentemente, baixas taxas de desenvolvimento embrionário. Devido a isso, o suíno é umas das espécies de escolha, para o estudo dos mecanismos que envolvem a polispermia, inclusive em outras espécies.

Palavras chave: Fecundação *in vitro*. Maduração *in vitro*. Monospermia. Ovócitos suínos.

ABSTRACT

Polyspermy is the most common pathological condition observed during the fertilization of oocytes and, in pigs its present greatest incidence, both *in vivo* and *in vitro*. *In vitro* fertilization is a technique that allows the study of the mechanisms by which the oocytes to block polyspermy, a fact of great importance, since in pigs, their occurrence exceeds 50% of oocytes penetrated. *In vitro*, the polyspermy occur due to several factors, and among those, are indicated, the fertilization of immature and/or aged oocytes, the high sperm capacitated concentration used, the failures in the process of reaction of the zona pellucida after the sperm penetration and failures in the release of cortical granules. Furthermore, *in vitro* studies have evaluated the role of cells and secretion of the oviduct and also the preovulatory follicular fluid in blocking the polyspermy in pigs. The addition of numerous molecules to the culture media in attempt to decrease the high rates of polyspermic penetration during the technique have also be performed. Other factors of high importance in the polyspermic penetration rates are the pH control and the calcium levels in the media used, the use of elevated temperatures during the fertilization and also the stay of high concentrations of potassium ions, very important for a appropriate hypermotility process, capacitation and acrosome reaction. Thus, suboptimal conditions in these characteristics also induce an increase in polyspermic fertilization rates. Therefore, the main problem of the *in vitro* fertilization is the high incidence of polyspermy and consequently low rates of embryonic development. Because of this, the pig is one species of choice for studying the mechanisms that involve the polyspermy, including in other species.

Key words: *In vitro* fertilization. *In vitro* maturation. Monospermy. Pig oocytes.

INTRODUÇÃO

A fertilização *in vitro* (FIV) é uma biotecnologia em que todos os processos fisiológicos de maturação folicular, fecundação e desenvolvimento embrionário são obtidos em laboratório (*in vitro*), fora do corpo animal (LONG et al., 1999). Define-se como a união ou co-cultivo de espermatozoides capacitados e ovócitos maduros de forma que a penetração espermática tenha lugar fora do organismo materno (KOO et al., 2005).

Essa técnica é utilizada para estudos relacionados a fecundação, função espermática, maturação de ovócitos, sistemas de capacitação de espermatozoides, mecanismos envolvidos na interação entre gametas e o estudo dos sinais que intervêm no processo de desenvolvimento e diferenciação do embrião. Todos esses aspectos de grande importância, tanto nas espécies animais como na humana (COY; ROMAR, 2002; ALMIÑANA et al., 2005).

A fertilização monospermica é um passo essencial para o processo reprodutivo em suínos (XIA et al., 2001). O bloqueio da polispermia é indispensável para o sucesso da fertilização e sobrevivência dos embriões nesta espécie (COY; AVILÉS, 2010). De acordo com Coy et al. (2008) o desenvolvimento de um futuro embrião depende da capacidade do ovócito proteger a si mesmo contra um excesso de espermatozoides e invasão de potenciais microorganismos patogênicos ou parasitas.

Apesar de existirem sucessos na obtenção de suínos a partir da FIV, com o uso de ovócitos oriundos de folículos ovarianos de fêmeas abatidas em frigoríficos, as porcentagens de sucesso e o número de leitões obtidos ainda são baixos (NAGAI, 1996). Em termos de eficiência a técnica não está muito bem evoluída (COY; ROMAR, 2002), sendo o principal entrave a um maior desenvolvimento da técnica os elevados e índices de polispermia (TOKESHI et al., 2007). Devido a isso, estudos têm sido conduzidos para se desenvolver métodos/procedimentos eficientes de maturação *in vitro* (MIV), FIV, cultivo *in vitro* (CIV) para a produção de embriões suínos viáveis derivados destas biotécnicas (ABEYDEERA; DAY, 1997; COY; ROMAR, 2002; SHERRER et al., 2004).

Diante do exposto, o objetivo da presente revisão é descrever alguns fatores que afetam a incidência da polispermia nos atuais sistemas de FIV em suínos.

POLISPERMIA

A polispermia pode ser definida como a penetração de mais de um espermatozoide dentro do ovócito durante o processo de fecundação (WANG et al., 2003; BIJTTEBIER et al., 2008). Geralmente é considerado um fenômeno patológico nos mamíferos (XIA et al., 2001). Na FIV, este acontecimento é observado por meio da presença de mais de dois pró-núcleos no interior do ovócito ou a presença de vários espermatozoides penetrados.

A fertilização polispérmica gera um desenvolvimento anormal do zigoto e com isso morte embrionária recente ou um aborto espontâneo (COY; AVILÉS, 2010). Têm a sua ocorrência pouco frequente nos mamíferos domésticos, sendo que ocorre em outras espécies de maneira fisiológica, como por exemplo, nas aves (COY; ROMAR, 2002).

Em suínos, a polispermia tanto *in vivo* quanto *in vitro*, ocorre mais frequentemente que nas demais espécies de mamíferos. Este acontecimento depende de diversos fatores, tais como o ambiente da fecundação, a qualidade dos espermatozoides e o número de sítios de fertilização, destacando é claro que em condições fisiológicas a sua ocorrência não afeta os índices de nascimento (FAUSTINI et al., 2010). Por ter ocorrência frequente, a espécie suína é considerada modelo de estudo desta patologia (COY et al., 2008).

A polispermia é um problema persistente durante a produção *in vitro* de embriões suínos. Por outro lado, sua incidência *in vivo* é menor que 5% (FUNAHASHI et al., 2000). Wu et al. (2004) encontraram porcentagens de polispermia maiores que 65% do total de ovócitos madurados e penetrados *in vitro*. Já os índices de polispermia na FIV com ovócitos obtidos a partir de lavagens do oviduto foi de 28%. O fato é que elevados índices de polispermia ocorrem durante a FIV quando comparado a fertilização *in vivo* (COY; AVILÉS, 2010).

De acordo com Coy e Romar (2002), a polispermia é o evento mais importante quando se trabalha com FIV, sendo que a mesma pode chegar a alcançar taxas que variam de 40 a 60%, quando a porcentagem de ovócitos penetrados esteja próxima aos 100%. *In vivo* esta pode ter taxas de 30 a 40%, sendo que não se sabe até que ponto este acontecimento pode ser considerado uma condição fisiológica para a espécie suína e se

os ovócitos suínos possuem algum mecanismo para remover os espermatozoides em excesso no citoplasma (XIA et al., 2001).

Um sistema ideal de FIV de suínos deve ter taxas de penetração elevadas (>80%) e baixa incidência de polispermia (<10%) (ABEYDEERA, 2002). Portanto, é possível verificar a importância que tal fato representa para o processo como um todo.

De acordo com Coy e Romar (2002) pesquisas têm sido realizadas com objetivo de diminuir as elevadas taxas de polispermia obtidas durante a FIV em suínos. Estas pesquisas envolvem o estudo de diferentes meios de cultivo e modificações dos mesmos, utilização de diferentes concentrações espermáticas e realização da FIV com diferentes tempos de co-cultivo dos espermatozoides com os ovócitos.

O bloqueio da polispermia em suínos está localizado em dois locais, na zona pelúcida (ZP) e na membrana plasmática do ovócito (XIA et al., 2001). Além disso, diferentes regiões do trato reprodutivo feminino, particularmente do oviduto, também ajudam o ovócito a se proteger do excesso de espermatozoides (COY; AVILÉS, 2010).

A ocorrência da polispermia na FIV ocorre devido a inúmeros fatores. Dentre eles a fertilização de ovócitos imaduros, a fertilização de ovócitos velhos já em processo de degeneração, anormalidades durante a reação da ZP e na própria estrutura da ZP e elevado número de espermatozoides capacitados em contato com o ovócito (WANG et al., 2003).

FERTILIZAÇÃO DE OVÓCITOS IMADUROS

Os resultados da FIV não dependem apenas da qualidade do sêmen, mas também da qualidade dos ovócitos que são utilizados (LI et al., 2003). Ovócitos madurados *in vitro* apresentam reação cortical menos correta que em condições naturais, pois mostram uma errônea distribuição dos grânulos ao redor do ovócito. Com isso, a liberação dos grânulos após a penetração espermática não é suficiente para que ocorra a reação cortical e consequente bloqueio da entrada de mais espermatozoides (BUREAU et al., 2000; FUNAHASHI et al., 2000). Portanto, ovócitos imaduros não possuem adequada habilidade de bloquear a penetração de excessivos espermatozoides durante a FIV (LONG et al., 1999; COY; ROMAR, 2002).

Na maioria dos mamíferos, a FIV de ovócitos imaduros, quando comparados com ovócitos maduros, gera altos índices de polispermia (WANG et al., 2003; COY et al., 2008). Após a fecundação um exame dos grânulos corticais (GC) liberados pelos ovócitos imaduros podem indicar uma penetração polispérmica devido a falhas de maturação e liberação dos grânulos após a penetração de um espermatozoide (ROMAR et al., 2005). Além disso, a falha no processo de maturação leva a uma falha de liberação dos grânulos e, também, incompleta ativação do ovócito para posterior desenvolvimento dos pró-núcleos (COY; AVILÉS, 2010).

Os ovócitos imaduros possuem uma incompleta ativação após a penetração espermática, porém, poucas hipóteses explicam este fenômeno (ASANO; NIWA, 2004). A primeira hipótese é o baixo trânsito de cálcio nos ovócitos imaduros, após a penetração espermática, quando comparado com ovócitos maduros. A menor entrada de cálcio no ovócito leva a baixa formação do segundo mensageiro 1,4,5-trifosfato de inositol (IP3). Além disso, ovócitos imaduros não são sensíveis à estimulação de ativação pelos aumentos das concentrações de cálcio intracelular (WANG et al., 2003).

A segunda hipótese é a incompleta migração dos GC para a periferia dos ovócitos (KIM et al., 1997). Essa migração é fundamental para uma eficiente liberação dos mesmos após a penetração espermática (NAGAI, 1996). A terceira é a redução do retículo endoplasmático cortical, que durante o processo de maturação, principalmente na fase final, deveria estar em número aumentado. Os retículos endoplasmáticos são os principais reservatórios intracelulares de cálcio (ABEYDEERA; DAY, 1997). Portanto, menor quantidade de retículos endoplasmáticos corticais, gera menor concentração de íons cálcio. Ovócitos imaduros também possuem reduzidas reservas de cálcio no interior dos poucos retículos endoplasmáticos. Com isso é mais susceptível não só a falhas no processo de ativação após a penetração como também no controle da polispermia (WANG et al., 2003).

A quarta hipótese é a redução de receptores ovocitários para IP3 no córtex dos ovócitos imaduros. Durante o período final de maturação, os receptores de IP3 estão significativamente aumentados e, como os ovócitos imaduros possuem poucos receptores para este segundo mensageiro, estes são incapazes de responder

adequadamente ao processo de ativação e posterior bloqueio da polispermia (WANG et al., 2003).

Portanto, várias mudanças ocorrem durante os processos de maturação do ovócito, principalmente nas etapas finais deste processo. A maturação inclui o desenvolvimento da habilidade do ovócito ser ativado e também a capacidade de impedir a ocorrência da polispermia (COY; AVILÉS, 2010).

FERTILIZAÇÃO DE OVÓCITOS VELHOS

A idade dos ovócitos é um fator importante para a ocorrência não só da polispermia como também das baixas taxas de penetração e eficiência da FIV (COY; ROMAR, 2002). O tempo de vida funcional para que o ovócito consiga bloquear a ocorrência da polispermia é muito curto (WANG et al., 2003). Portanto, elevada incidência de polispermia ocorre em grande parte dos ovócitos fertilizados após longo tempo de ovulação/maturação, sendo estes achados observados tanto *in vivo* como durante a FIV (ABEYDEERA, 2002).

A monocamada dos GC, com o passar do tempo, passa a ser descontínua devido a uma degradação dos grânulos. Isso leva o ovócito a não mais ter a capacidade de liberação desses grânulos após a penetração espermática (LONG et al., 1999). A principal razão da polispermia em ovócitos velhos é a parcial exocitose do conteúdo dos GC após a penetração espermática (KIM et al., 1997).

Mudanças no citoplasma e no espaço perivitelínico do ovócito, com o passar da idade, induzem alterações que vão refletir na incapacidade em bloquear a polispermia (MUGNIER et al., 2009). Nos ovócitos velhos há redução da densidade dos GC, sendo assim, não mais apresenta por completo a capacidade de bloquear a penetração de mais de um espermatozoide (WANG et al., 2003).

Há controvérsias se as altas taxas de fertilização polispérmica em ovócitos suínos velhos são devido a redução da densidade dos GC, a redução da atividade das enzimas presentes nos grânulos ou a falha da ZP em responder de maneira adequada à liberação desses grânulos (WANG et al., 2003). Com o passar da idade, a degeneração do citoplasma do ovócito faz com que todas as funções associadas a ativação e bloqueio da polispermia sejam afetadas e, portanto, a reação cortical não se realiza de maneira

correta. Ovócitos velhos, quando fertilizados normalmente, apresentam seu desenvolvimento posterior significativamente comprometido, indicando que todas as funções celulares são afetadas com o passar da idade (WU et al., 2004).

NÚMERO DE ESPERMATOZOIDES

Em condições fisiológicas, o istmo e o oviduto regulam o número de espermatozoides disponíveis no local da fecundação por atuar como um reservatório espermático (DUBUC; SIRARD, 1996), evitando e/ou diminuindo a ocorrência da polispermia (WANG et al., 2003). O trato genital feminino limita, ou melhor, bloqueia a chegada de espermatozoides no local da fecundação em uma ordem que se mantém de mais ou menos 1:1 (BUREAU et al., 2000). Portanto, aumentos das taxas de polispermia *in vivo* ocorrem primariamente devido a um anormal e elevado número de espermatozoides competentes e capacitados que entram em contato com a superfície do ovócito. De acordo com Mugnier et al. (2009) quanto mais espermatozoides adequadamente capacitados forem depositados no sítio de fecundação, mais ovócitos serão penetrados por mais de um espermatozóide.

Ovócitos madurados *in vitro* são expostos a um excessivo número de espermatozoides por um longo período de tempo para que ocorra a fecundação. Esta condição é um dos principais fatores que predispõem os ovócitos a penetração polispérmica (ABEYDEERA, 2002).

Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstram que o número de espermatozoides no local de fecundação está diretamente relacionado com as taxas de polispermia (SOMFAI et al., 2008). Abeydeera e Day (1997) demonstraram que as taxas de fertilização polispérmica foram aumentadas quando houve um aumento do número de espermatozoides capacitados em contato com o ovócito. Faustini et al. (2010) obtiveram expressiva correlação entre o número absoluto de espermatozoides por ovócito durante a fertilização e o grau de polispermia.

Diante disso, uma solução simples e prática seria a redução do número de espermatozoides utilizados por ovócito durante a fertilização. Porém, na maioria destes casos são baixas as taxas de penetração (ABEYDEERA, 2002). Portanto, ainda não está completamente claro porque uma alta concentração de espermatozoides é necessária

para obtenção de índices satisfatórios de fertilização e penetração *in vitro* (WANG et al., 2003). Provavelmente, as condições de capacitação são subótimas quando comparado a mesma situação *in vivo*. Isso faz com que no momento da fecundação esteja presente em grande quantidade, tanto espermatozoides capacitados quanto não capacitados. Conseqüentemente há ocorrência de reação acrossômica espontânea antes de o espermatozoide entrar em contato com o ovócito (SOMFAI et al., 2008). Portanto, a disponibilidade de espermatozoides adequadamente capacitados na FIV pode ajudar no bloqueio da polispermia (SUZUKI et al., 2003).

Protocolos de seleção espermática na FIV são utilizados na tentativa de se remover espermatozoides inviáveis e manter apenas espermatozoides viáveis e com maior sobrevivência (BUREAU et al., 2000; COY; ROMAR, 2002). Essa seleção é importante no que se refere ao número de espermatozoides viáveis a serem utilizados, pois, se o método for suficientemente eficiente, consegue-se uma melhor separação de espermatozoides com maior capacidade fecundante. Com isso, um menor número de espermatozoides pode ser utilizado na FIV e conseqüentemente uma melhora nos resultados de polispermia podem ser obtidos (NAGAI, 1996).

BLOQUEIO DA POLISPERMIA PELA ZONA PELÚCIDA

A ZP é uma matriz extracelular glicoprotéica semitransparente, altamente hidratada, viscosa e elástica que rodeia os ovócitos. Surge durante o crescimento dos ovócitos e amplia seu tamanho a medida que os mesmos aumentam seu diâmetro (WANG et al., 2003). O aparecimento da ZP está associado ao início do crescimento ovocitário sendo os componentes protéicos desta estrutura sintetizados e secretados pelo ovócito em desenvolvimento (WU et al., 2004). Em suínos, a ZP é composta por aproximadamente 19% de carboidratos e 17% de proteínas em forma de glicoproteínas completas – quatro famílias, sendo: ZP1, ZP2, ZP3 e ZP4 (ROMAR et al., 2005).

Antes da fertilização, a ZP desempenha importante papel no controle da polispermia por ser uma barreira espécie-específica contra a penetração excessiva de espermatozoides no ovócito (BIJTTEBIER et al., 2008; COY et al., 2008). Está envolvida na ligação espermatozóide-ovócito (ROMAR et al., 2005), sendo o reconhecimento e ligação mediado por um acoplamento de carboidratos presentes nas

glicoproteínas de superfície específicas da ZP e proteínas presentes na membrana espermática (COY; AVILÉS, 2010). A ZP, além de bloquear a ocorrência da polispermia, apresenta importante função na manutenção da integridade do embrião durante seu desenvolvimento inicial antes da implantação uterina e, facilita seu transporte pelo oviduto até o útero (WU et al., 2004; ROMAR et al., 2005).

O mecanismo no qual a ZP bloqueia a polispermia ainda não está completamente elucidado. É conhecido que extensas modificações ocorrem nos conteúdos das substâncias presentes na ZP e nos GC (reação cortical) durante a ativação do ovócito no momento da fertilização. Isto induz alterações na estrutura da ZP levando ao seu “endurecimento”, impedindo assim a penetração de espermatozoides extras no interior do ovócito (WANG et al., 2003; COY et al., 2008).

In vivo, o endurecimento da ZP ocorre naturalmente após a fertilização, sendo esse processo resultado da exocitose dos GC presentes na superfície do ovócito. O seu conteúdo quando liberado no espaço perivitelínico provoca o endurecimento da ZP, impedindo a penetração de mais de um espermatozoide (BUREAU et al., 2000; FUNAHASHI et al., 2000).

As mudanças na ZP que levam ao seu endurecimento e impedimento da passagem de excessivos espermatozoides capacitados podem ser explicadas por um aumento da sua resistência a digestão proteolítica pelas enzimas presentes na membrana espermática (XIA et al., 2001). Essa resistência ocorre devido à internalização/mudança de conformação dos sítios de ligação dos espermatozoides na ZP, induzindo assim ligações cruzadas entre as próprias proteínas da ZP, levando a não ocorrência da ligação de demais espermatozoides (COY et al., 2008).

Portanto, a ocorrência da polispermia na FIV em suínos pode ser relacionada à falha da exocitose dos GC e a incompleta ou a não reação da ZP a penetração de um espermatozoide (COY; ROMAR, 2002).

PAPEL DAS CÉLULAS E SECREÇÕES DO OVIDUTO EM BLOQUEAR A POLISPERMIA

O oviduto, em resposta ao estímulo dos hormônios esteróides ovarianos, é responsável pela síntese e secreção de proteínas e produção de um transudado seroso

diferenciado secretado no lúmen ovidutal (KOUBA et al., 2000). As células do epitélio ovidutal são estruturas importantes para o evento da fertilização, além de controlar em parte a ocorrência da polispermia (DUBUC; SIRARD, 1996). De acordo com Wang et al. (2003), antes da fecundação os espermatozoides permanecem parados na região da ampola do útero antes de chegar ao istmo. Quando em contato com a extremidade apical das células do oviduto, os espermatozoides podem ter a sua motilidade aumentada e o processo de reação acrossômica inibido; sendo que apenas umas poucas centenas são capazes de chegar ilesos ao sítio de fertilização. Portanto, apenas espermatozoides adequadamente capacitados conseguem chegar ao local da fecundação, no sítio de reserva espermática.

Na FIV, o co-cultivo de ovócitos com células do epitélio ovidutal demonstrou que estas células são capazes de inibir a penetração de mais de um espermatozoide (DUBUC; SIRARD, 1996). De acordo com os mesmos autores, a ligação dos espermatozoides com estas células pode controlar sua habilidade em sofrer reação acrossômica e, conseqüentemente, do ovócito em impedir a penetração polispérmica.

A presença de inúmeras proteínas e glicoproteínas no oviduto que apresentam função de ligação com os espermatozoides, e com isso, levando a redução da ocorrência de polispermia, têm sido demonstradas (KIDSON et al., 2003). A síntese dessas proteínas e seu transporte dentro do lúmen ovidutal, durante as fases do ciclo estral, criam um microambiente capaz de suportar importantes eventos reprodutivos ao longo da vida da fêmea, que incluem a fertilização, clivagem e desenvolvimento embrionário inicial (KOUBA et al., 2000). Esses achados comprovam-se através da manutenção do potencial de penetração, sem aumento nas taxas de polispermia em espermatozoides pré-incubados com células ovidutais (ROMAR et al., 2001; KIDSON et al., 2003).

Dentre as proteínas presente no oviduto, a “*Glicoproteína Específica do Oviduto*” (OGP), é muito importante para a regulação da ligação dos espermatozoides a ZP dos ovócitos (KOUBA et al., 2000; McCAULEY et al., 2003). Esta proteína tem sido identificada em diversas espécies, incluindo os suínos. É secretada pelo oviduto sendo dependente de altas concentrações do hormônio estrógeno. Possui sequencia de nucleotídeos altamente conservada em várias espécies e, em suínos, a maioria das isoformas encontradas são OGP-E1, OGP-E2 e OGP-E3 (McCAULEY et al., 2003).

Esta glicoproteína está presente e ligada na zona ZP, no espaço perivitelínico, na membrana plasmática de ovócitos e em embriões provenientes do oviduto. Portanto, com estes achados, sugere-se que a OGP desempenha importante papel na regulação da fertilização, principalmente no controle da ligação-penetração espermática e no desenvolvimento embrionário inicial.

McCauley et al. (2003) comprovaram que a OGP, quando adicionada nos meios de FIV e CIV não afetou o número de blastocistos formados. Porém, a porcentagem de embriões normais (diplóides) foi maior com o acréscimo desta proteína, sendo este fato explicado devido uma menor ocorrência de polispermia. Portanto, o número de embriões capazes de sobreviver a termo é aumentado quando se realiza a fertilização e o CIV com a adição da OGP.

Dubuc e Sirard (1996) pesquisaram qual a parte do oviduto, istmo ou a ampola, é a principal responsável pelo controle da penetração polispérmica. A conclusão foi que as células do istmo são mais eficazes em prevenir a ocorrência de polispermia, pois quando os ovócitos foram cultivados com as células do istmo houve maior porcentagem de penetração monospérmica quando comparado com as células da ampola. Estes achados se devem a maior capacidade que as células do istmo possuem de se ligarem aos espermatozoides em comparação com a ampola (BUREAU et al., 2000).

O oviduto apresenta também a capacidade de afetar a membrana plasmática do espermatozoide, estabilizando e reduzindo o número destes que se tornam capacitados simultaneamente (WANG et al., 2003). Com isso, há uma redução do número de espermatozoides que entram em contato com o ovócito e uma menor probabilidade de ocorrência de penetrações polispérmicas.

Além das características das células do oviduto em bloquear a polispermia, também tem sido demonstrado que as interações entre as células do oviduto e as secreções tanto dos ovócitos quanto dos espermatozoides auxiliam no bloqueio da penetração de mais de um espermatozoide (PARK; SIRARD, 1996). Além disso, tem sido sugerido que várias glicoproteínas presente no fluido ovidutal podem entrar no espaço perivitelínico ou na membrana plasmática ovocitária e facilitar o sincronismo na exocitose dos GC e promover adequada reação da ZP.

Portanto, sistemas de co-cultivo tanto de espermatozoides quanto de ovócitos com células epiteliais do oviduto, antes ou durante os processos de FIV, podem ser um bom método para a ocorrência de fertilizações normais em suínos (WANG et al., 2003).

SUBSTÂNCIAS QUE AFETAM A OCORRÊNCIA DA POLISPERMIA

Os meios de cultivo utilizados na FIV de suínos possuem importante papel no sucesso da técnica (LONG et al., 1999). Um dos mais importantes componentes suplementados nos meios de MIV, FIV e CIV são as proteínas; apesar de estudos mostrarem que meios de cultivo sem sua suplementação, também são capazes de promoverem penetrações espermáticas (ABEYDEERA; DAY, 1997; SHERRER et al., 2004). A suplementação dos meios com proteínas é importante para a manutenção da motilidade espermática, posterior processo de capacitação e também para a reação acrossômica (COY et al., 1999).

Outros componentes frequentemente adicionados nos meios são a albumina sérica bovina (BSA) e o soro fetal bovino (FCS) (COY; ROMAR, 2002). O uso destas substâncias ainda apresenta algumas dúvidas, pois alguns trabalhos relatam que a utilização de uma ou outra, dependendo da espécie em que se está trabalhando, pode afetar de maneira positiva ou negativa as taxas de penetração espermática, os índices de polispermia e conseqüentemente a eficiência da técnica (WANG et al., 2003). Alguns trabalhos demonstraram que o FCS apresenta efeitos negativos nos meios utilizados para FIV e que a sua utilização deve ser substituída, como por exemplo, por soro albumina (ABEYDEERA, 2002).

A seguir descrevem-se substâncias que são adicionadas nos meios de MIV, FIV e CIV e, que apresentam efeitos positivos ou negativos na ocorrência de polispermia.

FLUIDO FOLICULAR SUÍNO PRÉ-OVULATÓRIO

O fluido folicular (FF) suíno é um componente comumente adicionado aos meios de cultivo e sistemas de FIV, sendo considerado um transudado do soro sanguíneo (ABEYDEERA, 2002). Apresenta efeito benéfico na FIV, porém, as moléculas responsáveis por estes efeitos ainda não foram identificadas e também não é sabido se são inúmeras ou apenas uma molécula que desempenha o papel principal

(COY; AVILÉS, 2010). É sabido que os efeitos benéficos do FF são dependentes do diâmetro dos folículos em que foram obtidos. Quanto maiores os folículos e mais próximos ao momento de ovulação, melhores são os resultados da FIV e da qualidade dos embriões suínos obtidos a partir da utilização deste fluido (VATZIAS; HAGEN, 1999).

O FF suíno pré-ovulatório quando utilizado nos meios de cultivo para maturação ovocitária é responsável por uma diminuição das taxas de polispermia (BIJTTEBIER et al., 2008). Quando há utilização do FF, ocorre um significativo aumento da expansão das células do COCs nos ovócitos em comparação com meios que não possuem este componente. Esta camada de células é estimulada a se proliferar pela presença do FF, sendo este um constituinte fundamental dos meios de MIV e FIV. Com isso, os índices de polispermia são menores devido a uma menor taxa de penetração (previnem a penetração excessiva) dos ovócitos através das células do COCs. Portanto estas células propiciam um decréscimo nas taxas de polispermia.

Outro papel importante no controle da polispermia é o endurecimento da ZP após a penetração de um espermatozoide (KIM et al., 1997). Este endurecimento deve-se principalmente ao FF suíno. Portanto, uma das justificativas para a adição dessa substância nos meios de MIV dos ovócitos suínos (WANG et al., 2003). O FF pré-ovulatório, adicionado nos meios de MIV, aumenta o tempo de digestão da ZP pelos espermatozoides e posterior fertilização, sendo o endurecimento da ZP um dos principais mecanismos que o ovócito apresenta contra a ocorrência da polispermia (COY et al., 2008).

O FF apresenta elevadas quantidades do oligossacarídeo sulfato de condroitina. Esse sulfato atua nos espermatozoides por bloquear sua atividade antihialuronidase após o endurecimento da ZP. Com isso, os espermatozoides que entram em contato com a ZP após o seu endurecimento, não conseguem penetrá-la (TOKESHI et al., 2007). Portanto, o FF é uma das substâncias responsáveis por bloquear a polispermia em suínos além de favorecer o endurecimento da ZP.

Outro fator é a presença de glutatona sendo produzida pelas células do COCs durante o seu crescimento e maturação (NAGAI, 1996). A glutatona desempenha importante papel como substância biológica protetora do ovócito contra o estresse

oxidativo, impedindo a formação de radicais livres que possam destruir e/ou diminuir a capacidade fecundante do ovócito (ABEYDEERA et al., 1999; COY et al., 1999). A concentração de glutatona aumenta devido ao aumento de sua síntese intracelular de acordo com o crescimento do ovócito (WHITAKER; KNIGHT, 2004).

A glutatona desempenha inúmeras funções no DNA ovocitário, na síntese protéica e no transporte de aminoácidos. Promove a formação dos pró-núcleos masculino e feminino após a união dos gametas além de apresentar efeitos benéficos no desenvolvimento embrionário. Bijttebier et al. (2008) observaram elevados conteúdos de glutatona nas células do COCs de ovócitos madurados com acréscimo de FF pré-ovulatório. Isto indica que o FF desempenha importante função de aumentar a síntese de glutatona pelo ovócito e assim prevenir os possíveis danos oxidativos gerados. Este fato gera uma maior qualidade ovocitária e, conseqüentemente, menores chances de quando fecundado, o ovócito seja penetrado por mais de um espermatozoide (BOQUEST et al., 1999).

PROTEÍNAS E/OU ENZIMAS QUE ATUAM NO CONTROLE DA POLISPERMIA

Diversas pesquisas demonstram que a atividade de algumas proteínas e/ou enzimas, presentes tanto no espermatozoide como no ovócito, desempenham importantes ações no controle da polispermia (MAO et al., 2005; MUGNIER et al., 2009). Algumas destas proteínas/enzimas serão descritas a seguir.

A Ubiquitina (UB) é uma proteína da membrana espermática altamente conservada que possui em sua estrutura 76 resíduos de aminoácidos (SEKIGUCHI et al., 2006; YI et al., 2007). Espermatozoides suínos possuem elevada atividade de hidrólise da UB no seu acrossoma. Devido a isso, a capacidade de clivar estas moléculas de sua membrana antes de penetrar no ovócito é elevada. Assim, o espermatozoide consegue penetrar com maior facilidade a membrana ovocitária.

Quando bloqueada a atividade de hidrólise da UB há diminuição dos índices de fecundação polispérmica e, conseqüentemente, maior proporção de ovócitos penetrados por apenas único espermatozoide. Isto ocorre porque os espermatozoides apresentam maior dificuldade em penetrar o ovócito, conseqüentemente dificultando a sua entrada

em excesso. Portanto, a modulação da atividade de hidrólise da UB pode alterar a ocorrência de polispermia durante a FIV e, é sugerido que, essa modulação deva ocorrer em nível de acrossoma dos espermatozoides.

A superóxido dismutase (SOD) é uma enzima estudada na FIV. Esta é responsável por degradar os radicais livres formados nos meios de MIV, FIV e CIV de embriões suínos (PARK et al., 1997) atuando como captadora de radicais livres. Portanto é benéfica ao desenvolvimento embrionário por evitar danos oxidativos excessivos à membrana plasmática do ovócito. Park et al. (1997) observaram que a adição da SOD aos meios de MIV e FIV não diminuiu os índices de polispermia, porém, sua utilização foi benéfica no aumento das taxas de penetração. Portanto, estudos são necessários utilizando esta enzima, uma vez que sua ação de inibir a produção de radicais livres é importante para que, tanto espermatozoides quanto ovócitos, permaneçam íntegros e desempenhem corretamente suas funções e, no caso do ovócito, impedir a penetração polispérmica (PRATHER; DAY, 1998).

O ácido hialurônico (HA) também já foi testado nos protocolos de FIV na tentativa de se aumentar as taxas de monospermia. Este é membro da família dos glicosaminoglicanos e, é conhecido de forma geral por modular as funções das células somáticas (SUZUKI et al., 2000). O HA está presente no fluido ovidutal e fluido uterino (ROMAR et al., 2005). De acordo com Nagai (1996) este é secretado pelas células do COCs durante o processo de MIV e pode desempenhar uma função de modular a capacitação dos espermatozóides suínos (SUZUKI et al., 2000).

Romar e Funahashi (2006), com objetivo de avaliar a maturação nuclear e citoplasmática *in vitro*, estudaram o efeito da adição de Roscovitina (RO), um inibidor da transcrição e síntese protéica, como pré-tratamento de ovócitos suínos antes da fertilização. Esta substância é responsável pela manutenção do ovócito na fase de metáfase do ciclo celular. Isso, pois mais de 90% dos ovócitos quando retirados da inibição pela RO, desenvolvem-se até o estágio de metáfase II. Ovócitos tratados com esta substância permaneceram no estágio de vesícula germinativa por maior tempo e, com isso, é possível obter maior efetividade na sincronização dos ovócitos iniciando a FIV na mesma fase do ciclo celular. As taxas de maturação nuclear não são afetadas com o seu uso, sendo observado um maior índice de penetração. Portanto, a RO

apresenta efeitos benéficos quando utilizada durante a pré-fertilização de ovócitos suínos.

A Osteopontina (SPP1) é uma proteína da matriz extracelular, primeiramente identificada em ossos e também já estudada na FIV em suínos (HAO et al., 2006). Foi identificada no endométrio de matrizes cíclicas e gestantes, sendo, a partir daí, encontrada em vários tecidos, como por exemplo, células epiteliais e secreções do trato gastrointestinal, rim, tireóide e também nos tecidos reprodutivos como o oviduto, o útero, placenta e testículos. Apresenta função de indução da fosforilação intracelular, aumentando os níveis de cálcio. Atua também no sistema reprodutor masculino e feminino, promovendo melhoras na eficiência da penetração espermática e ativação ovocitária.

Hao et al. (2006) reduziram a incidência de polispermia em aproximadamente 41% com a adição de SPP1 nos meios de FIV. Esta redução foi benéfica por não afetar as taxas de penetração aumentando assim a eficiência global da técnica. Diante disso, a SPP1 desempenha importante papel durante o processo de FIV, sendo que sua inclusão nos meios de fertilização pode aumentar a eficiência da técnica e a obtenção de embriões suínos viáveis.

Conforme descrito, os estudos das enzimas/proteínas UB (YI et al., 2007), SOD (PARK et al., 1997), HA (SUZUKI et al., 2000), pOSP (KOUBA et al., 2000), RO (ROMAR; FUNAHASHI, 2006) e SSP1 (HAO et al., 2006) comprovaram suas utilizações como moléculas que, de alguma forma, desempenham importantes funções no controle da polispermia durante a FIV. Pesquisas com estes componentes são úteis e futuramente tais moléculas devem ser utilizadas em conjunto para que, nos meios de MIV, FIV e CIV, estas sejam adicionadas, a fim de se diminuir ao máximo a ocorrência de polispermia, aumentando assim a eficiência da técnica (HAO et al., 2006). Além também do benefício de aumentar a ocorrência de fertilizações monospermicas e, com isso, aumentar a produção de embriões viáveis, em larga escala, para a utilização da técnica de transferência de embriões comercialmente. Isso facilitaria as pesquisas realizadas nas áreas biomédicas de transgênese, clonagem animal e xenotransplantes (COY; AVILÉS, 2010).

OUTROS FATORES QUE AFETAM A OCORRÊNCIA DA POLISPERMIA

A concentração espermática é um dos principais fatores que afetam a penetração espermática e a polispermia em ovócitos suínos. Um aumento da taxa de penetração é acompanhado por um aumento da polispermia. Assim uma ótima concentração deve ser determinada baseada na motilidade espermática, morfologia e componentes presentes nos meios de FIV utilizados para se elevar as taxas de penetrações monospermicas.

O íon cálcio é fundamental nos processos de capacitação espermática, reação acrossômica e ativação ovocitária (ABEYDEERA; DAY, 1997). Uma série de repetidos e elevados aumentos da concentração de cálcio intracelular é responsável por induzir a reação acrossômica e ativar o ovócito após a fusão do espermatozoide (SOMFAI et al., 2003). Papel importante do cálcio também está no aumento das taxas de penetração devido a indução da reação cortical e exocitose dos grânulos, sendo responsável pela reação da ZP, participando assim do bloqueio da polispermia.

O pH dos meios de MIV, FIV e CIV também é fundamental de ser observado, sendo que este regula a capacitação, a reação acrossômica e está associado com a liberação dos GC do ovócito. Alguns trabalhos mostram que quando o pH do meio está elevado há maiores taxas de fertilização, enquanto outros estudos não observam correlações positivas. Portanto, o pH elevado ainda não se mostra um fator claro e importante para resultados positivos nas taxas de fertilização (COY; ROMAR, 2002).

O íon bicarbonato é também um componente importante nos meios de FIV. Além de agir na manutenção da motilidade espermática, induz a capacitação e reação acrossômica (CÓRDOVA et al., 1997). De acordo com Wang et al. (2003) a relação entre os vários aditivos adicionados aos meios de MIV, FIV e CIV de embriões suínos estão sendo comprovados e cada vez mais utilizados na prática.

Elevadas temperaturas (38,5 – 39°C) também têm sido utilizadas na tentativa de se aumentar as taxas de sucesso no emprego da técnica de FIV. Elevadas temperaturas poderiam atuar estimulando uma maior capacitação espermática; porém, sua relação com a ocorrência da polispermia ainda não está bem esclarecida (WANG et al., 2003).

As concentrações do íon potássio (K^+) particularmente no oviduto e no útero são muito elevadas quando comparado com as suas concentrações no sangue (12,0 a 25,0 mM e 3,0 a 6,0 mM, respectivamente) (LIM et al., 1997). De acordo com Córdova et al.

(1997) o K^+ desempenha importante papel na fertilização, reação acrossômica e hipermotilidade dos espermatozoides momentos antes de entrarem em contato com o ovócito e durante a penetração e posterior fertilização. Lim et al. (1997) sugerem que o K^+ é importante para o processo de penetração espermática e que a sua concentração afeta os índices de polispermia, sendo que concentrações acima de 3,0 mM propiciam aumento nas taxas de penetração.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A eficiência das atuais técnicas, protocolos e procedimentos adotados para a MIV, FIV e CIV de embriões suínos tem aumentado nos últimos anos. Entretanto, deficiências nos mesmos, inclusive na produção *in vitro* de embriões ainda existem. Pode-se indicar como principal problema da técnica a alta incidência de penetrações polispermicas e conseqüentemente, baixas taxas de desenvolvimento embrionário.

Inúmeros trabalhos têm sido realizados na tentativa de se diminuir a ocorrência da polispermia, fenômeno tão comum nos atuais sistemas de FIV na espécie suína e que prejudica enormemente os seus resultados e a sua expansão. Devido a esta ocorrência elevada, a espécie suína é umas das espécies de escolha, para o estudo dos mecanismos que envolvem a polispermia, inclusive em outras espécies, como o homem.

A FIV em suínos é uma biotecnologia em crescente expansão e desenvolvimento. O aperfeiçoamento da técnica está se tornando cada vez maior e melhor. Trabalhos apontam para uma perspectiva positiva quanto a melhoras durante o desenvolvimento da técnica em suínos. Pesquisas nesse tema continuarão a serem desenvolvidas até que o acontecimento da penetração de mais de um espermatozoide (polispermia) esteja resolvido, ou se não, diminuído a tal ponto que não afete significativamente os resultados da técnica, principalmente no que diz respeito a obtenção de embriões suínos viáveis.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi apoiado em parte pela FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de

Nível Superior) e Programa de Graduação e Pós-graduação em Zootecnia e Veterinária. Gostaríamos de agradecer também ao Departamento de Medicina Veterinária e Zootecnia da UFLA pelo apoio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEYDEERA, L. R.; DAY, B. N. In vitro penetration of pig oocytes in a modified tris-buffered medium: Effect of BSA, caffeine and calcium. **Theriogenology**, v. 48, n. 4, p. 537-544, sep. 1997.

ABEYDEERA, L. R.; WANG, W. H.; CANTLEY, T. C.; PRATHER, R. S.; DAY, B. N. Glutathione content and embryo development after in vitro fertilisation of pig oocytes matured in the presence of a thiol compound and various concentrations of cysteine. **Zygote**, v. 7, n. 3, p. 203-210, aug. 1999.

ABEYDEERA, L. R. In vitro production of embryos in swine. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 256-273, jan. 2002.

ALMIÑANA, C.; GIL, M. A.; CUELLO, C.; ROCA, J.; VAZQUEZ, J. M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; MARTINEZ, E. A. Adjustments in IVF system for individual boars: value of additives and time of sperm-oocyte co-incubation. **Theriogenology**, v. 64, n. 8, p. 1783-1796, nov. 2005.

ASANO, A.; NIWA, K. Activation and penetration in vitro of pig oocytes treated with calcium ionophore. **The Journal of Reproduction and Development**, v. 50, n. 1, p. 77-85, feb. 2004.

BIJTTEBIER, J.; VAN SOOM, A.; MEYER, E.; MATEUSEN, B.; MAES, D. Preovulatory follicular fluid during in vitro maturation decreases polyspermic fertilization of cumulus-intact porcine oocytes in vitro maturation of porcine oocytes. **Theriogenology**, v. 70, n. 4, p. 715-724, sep. 2008.

BOQUEST, A. C.; ABEYDEERA, L. R.; WANG, W. H.; DAY, B. N. Effect of adding reduced glutathione during insemination on the development of porcine embryos in vitro. **Theriogenology**, v. 51, n. 7, p. 1311-1319, may. 1999.

BUREAU, M.; BAILEY, J. L.; SIRARD, M. A. Influence of oviductal cells and conditioned medium on porcine gametes. **Zygote**, v. 8, n. 2, p. 139-144, sep. 2000.

CÓRDOVA, A.; DUCOLOMB, Y.; JIMENEZ, I.; CASAS, E.; BONILLA, E.; BETANCOURT, M. In vitro fertilizing capacity of frozen-thawed boar semen. **Theriogenology**, v. 47, n. 7, p. 1309-1317, may. 1997.

COY, P.; RUIZ, S.; ROMAR, R.; CAMPOS, I.; GADEA, J. Maturation, fertilization and complete development of porcine oocytes matured under different systems. **Theriogenology**, v. 51, n. 4, p. 799-812, mar. 1999.

COY, P.; ROMAR, R. In vitro production of pig embryos: a point of view. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 14, n. 5, p. 275-286, 2002.

COY, P.; GRULLON, L.; CANOVAS, S.; ROMAR, R.; MATÁS, C.; AVILÉS, M. Hardening of the zona pellucida of unfertilized eggs can reduce polyspermic fertilization in the pig and cow. **Reproduction**, v. 135, n. 1, p. 19-27, jan. 2008.

COY, P.; AVILÉS, M. What controls polyspermy in mammals, the oviduct or the oocyte? **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 85, n. 3, p. 593-605, aug. 2010.

DUBUC, A.; SIRARD, M. A. Effect of steroids and oviductal cells, from the different parts of the oviduct, on the incidence of monospermy in porcine in vitro fertilization. **Theriogenology**, v. 46, n. 3, p. 449-458, aug. 1996.

FAUSTINI, M.; BUCCO, M.; GALEATI, G.; SPINACI, M.; VILLANI, S.; CHLAPANIDAS, T.; GHIDONI, I.; VIGO, D.; TORRE, M. L. Boar sperm encapsulation reduces in vitro polyspermy. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 2, p. 359-362, apr. 2010.

FUNAHASHI, H.; EKWALL, H.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Zona reaction in porcine oocytes fertilized in vivo and in vitro as seen with scanning electron microscopy. **Biology of Reproduction**, v. 63, n. 5, p. 1437-1442, nov. 2000.

HAO, Y.H.; MATHIALAGAN, N.; WALTERS, E.; MAO, J. D.; LAI, L. X.; BECKER, D.; LI, W. S.; CRITSER, J.; PRATHER, R. S. Osteopontin reduces polyspermy during in vitro fertilization of porcine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 75, n. 5, p. 726-733, nov. 2006.

KIDSON, A.; SCHOEVERS, E.; LANGENDIJK, P.; VERHEIJDEN, J.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M. The effect of oviductal epithelial cell co-culture during in vitro maturation on sow oocyte morphology, fertilization and embryo development. **Theriogenology**, v. 59, n. 9, p. 1889-1903, may. 2003.

KIM, N. H.; DO, J. T.; SONG, H.; KOO, D. B.; KIM, J. H.; LEE, H. T.; CHUNG, K. S. Involvement of adrenergic system on the cortical granule exocytosis and polyspermic penetration during in vitro fertilization of porcine oocytes. **Theriogenology**, v. 48, n. 8, p. 1351-1360, dec. 1997.

KOO, D. B.; KIM, Y. J.; YU, I.; KIM, H. N.; LEE, K. K.; HAN, Y. M. Effects of in vitro fertilization conditions on preimplantation development and quality of pig embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 90, n. 1-2, p. 101-110, nov. 2005.

KOUBA, A. J.; ABEYDEERA, L. R.; ALVAREZ, I. M.; DAY, B. N.; BUHI, W. C. Effects of the porcine oviduct-specific glycoprotein on fertilization, polyspermy, and embryonic development in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 63, n. 1, p. 242-250, jul. 2000.

LI, Y. H.; MA, W.; LI, M.; HOU, Y.; JIAO, L. H.; WANG, W. H. Reduced polyspermic penetration in porcine oocytes inseminated in a new in vitro fertilization (IVF) system: straw IVF. **Biology of Reproduction**, v. 69, n. 5, p.1580-1585, nov. 2003.

LIM, J. G.; KIM, N. H.; LEE, H. T.; CHUNG, K. S. Effects of extracellular potassium concentrations on acrosome reaction and polyspermy during in vitro fertilization and subsequent development in vitro in the pig. **Theriogenology**, v. 48, n. 5, p. 843-851, oct. 1997.

LONG, C. R.; DOBRINSKY, J. R.; JOHNSON, L. A. In vitro production of pig embryos: comparisons of culture media and boars. **Theriogenology**, v. 51, n. 7, p. 1375-1390, may. 1999.

MAO, J.; WU, G. M.; PRATHER, R. S.; SMITH, M. F.; CANTLEY, T.; RIEKE, A.; DIDION, B. A.; DAY, B. N. Effect of methyl-beta-cyclodextrin treatment of pig spermatozoa on in vitro fertilization and embryo development in the absence or presence of caffeine. **Theriogenology**, v. 64, n. 9, p. 1913-1927, dec. 2005.

McCAULEY, T. C.; BUHI, W. C.; WU, G. M.; MAO, J.; CAAMANO, J. N.; DIDION, B. A.; DAY, B. N. Oviduct-specific glycoprotein modulates sperm-zona binding and improves efficiency of porcine fertilization in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 69, n. 3, p. 828-834, sep. 2003.

MUGNIER, S.; DELL'AQUILA, M. E.; PELAEZ, J.; DOUET, C.; AMBRUOSI, B.; DE SANTIS, T.; LACALANDRA, G. M.; LEBOS, C.; SIZARET, P. Y.; DELALEU,

B.; MONGET, P.; MERMILLOD, P.; MAGISTRINI, M.; MEYERS, S. A.; GOUDET, G. New insights into the mechanisms of fertilization: comparison of the fertilization steps, composition, and structure of the zona pellucida between horses and pigs. **Biology of Reproduction**, v. 81, n. 5, p. 856-870, nov. 2009.

NAGAI, T. In vitro maturation and fertilization of pig oocytes. **Animal Reproduction Science**, v. 42, n. 1, p. 153-163, apr. 1996.

PARK, C. K.; SIRARD, M. A. The effect of preincubation of frozen-thawed spermatozoa with oviductal cells on the in vitro penetration of porcine oocytes. **Theriogenology**, v. 46, n. 7, p. 1181-1189, nov. 1996.

PARK, C. K.; LEE, J. H.; CHEONG, H. T.; YANG, B. K.; KIM, C. I. Effect of superoxide dismutase (SOD) on pronucleus formation of porcine oocytes fertilized in vitro. **Theriogenology**, v. 48, n. 7, p. 1137-1146, nov. 1997.

PRATHER, R. S.; DAY, B. N. Practical considerations for the in vitro production of pig embryos. **Theriogenology**, v. 49, n. 1, p. 23-32, jan. 1998.

ROMAR, R.; COY, P.; CAMPOS, I.; GADEA, J.; MATÁS, C.; RUIZ, S. Effect of co-culture of porcine sperm and oocytes with porcine oviductal epithelial cells on in vitro fertilization. **Animal Reproduction Science**, v. 68, n. 1-2, p. 85-98, oct. 2001.

ROMAR, R.; COY, P.; GADEA, J.; RATH, D. Effect of oviductal and cumulus cells on zona pellucida and cortical granules of porcine oocytes fertilized in vitro with epididymal spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 85, n. 3-4, p. 287-300, feb. 2005.

ROMAR, R.; FUNAHASHI, H. In vitro maturation and fertilization of porcine oocytes after a 48 h culture in roscovitine, an inhibitor of p34^{cdc2}/cyclin B kinase. **Animal Reproduction Science**, v. 92, n. 3-4, p. 321-333, may. 2006.

SEKIGUCHI, S.; KWON, J.; YOSHIDA, E.; HAMASAKI, H.; ICHINOSE, S.; HIDESHIMA, M.; KURAOKA, M.; TAKAHASHI, A.; ISHII, Y.; KYUWA, S.; WADA, K.; YOSHIKAWA, Y. Localization of ubiquitin C-terminal hydrolase L1 in mouse ova and its function in the plasma membrane to block polyspermy. **The American Journal of Pathology**, v. 169, n. 5, p. 1722-1729, nov. 2006.

SHERRER, E. S.; RATHBUN, T. J.; DAVIS, D. L. Fertilization and blastocyst development in oocytes obtained from prepubertal and adult pigs. **Journal of Animal Science**, v. 82, n. 1, p. 102-108, jan. 2004.

SOMFAI, T.; KIKUCHI, K.; ONISHI, A.; IWAMOTO, M.; FUCHIMOTO, D.; PAPP, A. B.; SATO, E.; NAGAI, T. Meiotic arrest maintained by cAMP during the initiation of maturation enhances meiotic potential and developmental competence and reduces polyspermy of IVM/IVF porcine oocytes. **Zygote**, v. 11, n. 3, p. 199-206, aug. 2003.

SOMFAI, T.; OZAWA, M.; NOGUCHI, J.; KANEKO, H.; KARJA, N. W.; FAHRUDIN, M.; NAKAI, M.; MAEDOMARI, N.; DINNYÉS, A.; NAGAI, T.; KIKUCHI, K. In vitro development of polyspermic porcine oocytes: Relationship between early fragmentation and excessive number of penetrating spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 107, n. 1-2, p. 131-147, aug. 2008.

SUZUKI, K.; ERIKSSON, B.; SHIMIZU, H.; NAGAI, T.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Effect of hyaluronan on monospermic penetration of porcine oocytes fertilized in vitro. **International Journal of Andrology**, v. 23, n. 1, p. 13-21, feb. 2000.

SUZUKI, H.; SAITO, Y.; KAGAWA, N.; YANG, X. In vitro fertilization and polyspermy in the pig: Factors affecting fertilization rates and cytoskeletal reorganization of the oocyte. **Microscopy Research and Technique**, v. 61, n. 4, p. 327-334, jul. 2003.

TOKESHI, I.; YOSHIMOTO, T.; MUTO, N.; NAKAMURA, S.; ASHIZAWA, K.; NAKADA, T.; TATEMOTO, H. Antihyaluronidase action of ellagic acid effectively prevents polyspermy as a result of suppression of the acrosome reaction induced by sperm-zona interaction during in vitro fertilization of porcine oocytes. **The Journal of Reproduction and Development**, v. 53, n. 4, p. 755-764, aug. 2007.

VATZIAS, G.; HAGEN, D. R. Effects of porcine follicular fluid and oviduct-conditioned media on maturation and fertilization of porcine oocytes in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 60, n. 1, p. 42-48, jan. 1999.

WANG, W. H.; DAY, B. N.; WU, G. M. How does polyspermy happen in mammalian oocytes? **Microscopy Research and Technique**, v. 61, n. 4, p. 335-341, jul. 2003.

WHITAKER, B. D.; KNIGHT, J. W. Exogenous gamma-glutamyl cycle compounds supplemented to in vitro maturation medium influence in vitro fertilization, culture, and viability parameters of porcine oocytes and embryos. **Theriogenology**, v. 62, n. 1-2, p. 311-322, jul. 2004.

WU, G. M.; LAI, L.; MAO, J.; McCAULEY, T. C.; CAAMAÑO, J. N.; CANTLEY, T.; RIEKE, A.; MURPHY, C. N.; PRATHER, R. S.; DIDION, B. A.; DAY, B. N. Birth of piglets by in vitro fertilization of zona-free porcine oocytes. **Theriogenology**, v. 62, n. 8, p. 1544-1556, nov. 2004.

XIA, P.; WANG, Z.; YANG, Z.; TAN, J.; QIN, P. Ultrastructural study of polyspermy during early embryo development in pigs, observed by scanning electron microscope and transmission electron microscope. **Cell and Tissue Research**, v. 303, n. 2, p. 271-275, feb. 2001.

YI, Y. J.; MANANDHAR, G.; SUTOVSKY, M.; LI, R.; JONÁKOVÁ, V.; OKO, R.; PARK, C. S.; PRATHER, R. S.; SUTOVSKY, P. Ubiquitin C-terminal hydrolase-

activity is involved in sperm acrosomal function and anti-polyspermy Defense during porcine fertilization. **Biology of Reproduction**, v. 77, n. 5, p. 780-793, nov. 2007.