

XVIII

CIC

XI ENPOS  
I MOSTRA CIENTÍFICA



Evoluir sem extinguir:  
por uma ciência do devir



## COMPARAÇÃO ENTRE mTBM E BTS NO TESTE DE PENETRAÇÃO *IN VITRO* COM OÓCITOS HOMÓLOGOS FRESCOS

**BRIZOLARA, Rosa Maraní Rodrigues<sup>1</sup>; CORCINI, Carine Dahl<sup>2</sup>; SILVA, Betris<sup>1</sup> Elert; DANIELI, Valquíria Maria<sup>2</sup>; GHELLER, Stela Mari<sup>2</sup>; SANTOS, Elisa Caroline da Silva<sup>3</sup>; VARELA JUNIOR, Antonio Sergio<sup>3</sup>; LUCIA, Thomaz Jr. <sup>2</sup>; BONGALHARDO, Denise Calisto<sup>1</sup>;**

<sup>1</sup>Laboratório de Biotécnicas da Reprodução de Aves - Instituto de Biologia - UFPel

<sup>2</sup>Laboratório de Reprodução Animal- Faculdade de Veterinária – UFPel

<sup>3</sup>Instituto de Ciências Biológicas – FURG

Campus Universitário s/n – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900

Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS. rosamarani\_r@hotmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

O teste de penetração *in vitro* (PIV) indica o número de espermatozóides capazes de reconhecer e ligar-se a zona pelúcida (Waberski et al, 1993) e é um dos métodos utilizados para se estimar o potencial de fertilidade do macho suíno. Para que o teste de penetração obtenha sucesso, é necessário que o espermatozóide tenha morfologia bem definida e motilidade progressiva (Macedo, 2006).

O Meio Tris Modificado (mTBM) é utilizado rotineiramente como diluente de sêmen para testes de penetração espermática realizados em laboratório (Macedo et al., 2006), enquanto o Beltsville Thawing Solution (BTS) é utilizado na central de inseminação artificial, para realizar as análises de sêmen. O uso do mesmo diluente para a realização de todos os testes facilitaria a rotina nas centrais de inseminação.

Esse trabalho teve como objetivo comparar o uso do BTS com o mTBM, para analisar se há diferença no uso desses meios para o teste de interação oócito-espermatozóide, incubados a 39°C por 6 horas.

### 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram analisados os padrões de motilidade espermática, vigor e morfologia. Somente foram utilizados pools de sêmen suíno que tiveram motilidade superior ou igual a 70% e vigor maior ou igual a 3 e com morfologia normal 85%. A motilidade

espermática se avalia através de microscopia ótica no aumento de 200X, o percentual de células vivas com movimentos progressivos, seguindo uma escala de 0 a 100%. O vigor espermático consiste em analisar a força do movimento dos espermatozóides, influenciado pela velocidade com que se movimenta, é observado no microscópio ótico com aumento de 200X e pode ser classificado de 0 a 5. Análise da morfologia das células espermáticas é avaliada através da contagem de 100 células, em microscopia ótica no aumento de 1000X com óleo de imersão. Nessa análise classifica-se os espermatozóides como normais e anormais.

Para a interação oócito-espermatozóide, são utilizados oócitos frescos, que são retirados de ovários coletados de fêmeas pré-púberes (aproximadamente 95Kg), independente da idade, abatidas no frigorífico Castro e transportadas para o laboratório em solução salina 0,9% a 39°C (Macedo, 2006). Os oócitos são retirados por punção folicular com auxílio de um aparelho aspiramax, em seguida são colocados em uma placa de Petri com PBS 1X e em uma lupa são “catados” 24 oócitos com o auxílio de uma micropipeta p-20, em seguida sofrem 20 “pipetagens”. Os oócitos são colocados juntamente com o sêmen nos tratamentos T1 e T2. Tratamento 1 é constituído de mTBM(controle) acrescido de lactato de cálcio, cafeína e BSA, e o Tratamento 2 de BTS, lactato de cálcio, cafeína e BSA. Nos dois tratamentos o sêmen é centrifugado. Os pools de sêmen são centrifugados a 1900g por 5 minutos, no final resuspende-se o pellet.

A relação a ser obtida é de 2000 espermatozóides por oócito na gota de PIV, ou seja, para grupos de 20 oócitos, precisa-se de 40000 espermatozóides. No teste do PIV, usado neste trabalho, os oócitos são considerados penetrados quando apresentarem a zona pelúcida penetrada por pelo menos um espermatozóide.

Após serem colocados em ependorfs nos distintos tratamentos, os oócitos e o sêmen são incubados a temperatura de 39°C por 6 horas. Era realizado o procedimento de pipetagens para retirada dos espermatozóides acessórios.

Ao término da incubação dos complexos oócitos-espermatozóides nos dois diferentes tratamentos, os mesmos são retirados e colocados em uma placa de Petri, onde são retirados os 24 oócitos de uma única vez, com uma micropipeta p-20. Os oócitos são transferidos para um ependorf com 400µl de PBS 1X, onde sofrem 20 “pipetagens” com o auxílio de micropipeta de 100µl, para retirar os espermatozóides acessórios. Após, os oócitos são novamente colocados em uma placa de Petri e transferidos para uma placa com pocinhos.

Para a verificação da taxa de penetração oócito-espermatozóide, os oócitos são expostos a uma solução de Hoescht 33258 e levados a estufa com temperatura de 38,5°C, por 15 minutos.

A interação pode ser avaliada em um microscópio de fluorescência no aumento de 400X, onde são colocados entre lâmina e lamínula e então avaliados. É feita a contagem de espermatozoides ligados à zona pelúcida (Hewit e England, 1997).

Os dados da taxa de penetração foram analisados utilizando o teste do Qui-quadrado. (Statistix, 2003)

### 3. RESULTADO E DISCUSSÃO

A polispermia no tratamento com mTBM foi significativamente maior que no tratamento com BTS. Já no teste de penetração não houve diferença entre os tratamentos. (Tabela 1)

Tabela1- Os efeitos do meio de fertilização sobre a interação dos gametas femininos com os gametas masculinos na execução do teste de penetração *in vitro*.

Tratamento	Número de oócitos	Taxa de penetração (n)	Nº de espermatozoides por oócito
BTS	490	77,4% (339) <sup>a</sup>	1,54 ± 1,43 <sup>b</sup>
mTBM	438	72,9% (357) <sup>a</sup>	2,23 ± 1,95 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup>Expoentes distintos indicam significância estatística (P < 0,0001 )

Os resultados de polispermia sugerem que o BTS promove uma menor taxa de capacitação, o que é importante na produção *in vitro* de embriões, visto que a polispermia é deletéria para o desenvolvimento de um zigoto normal. Durante a fecundação *in vivo*, ocorre a reação de zona que é um mecanismo protetor que impede que mais de um espermatozóide penetre a membrana vitelina. (Stabenfeldt e Edqvist, 1996); esta reação não ocorre nos testes *in vitro*.

Embora a polispermia com BTS tenha sido maior, não houve diferenças entre os tratamentos com relação aos números de oócitos penetrados, sugerindo que o número total de oócitos fecundados ou embriões produzidos será o mesmo para os dois diluentes.

#### 4. CONCLUSÃO

Pode-se concluir que o BTS pode ser utilizado em substituição ao mTBM em testes de penetração oócito-espermatozóide.

#### 5. AGRADECIMENTO

À CAPES pela bolsa de doutorado do segundo autor.

#### 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARBATO, G.F.; CRAMER, P.G.; HAMMERSTEDT, R.H. A practical *in vitro* sperm-egg binding assay that detects subfertile males. **Biology of Reproduction**, v. 58, p. 686-699, 1998.
- BERGER, T.; ANDERSON, D.L.; PENEDO, M.C.T. Porcine sperm fertilizing potential in relationship to sperm functional capacities. **Animal Reproduction Science**, v.44, p. 231-239, 1996.
- CHILDS, J.E.; MILLS, J.N.; GLASS, G.E. Rodent-borne hemorrhagic fever viruses: a risk for mammalogists? **Journal of Mammalogy** 76, 664–680, 1995.
- HOGAN, B.; CONSTANTINI, F.; LACY, E.; Manipulating the mouse embryo: A Laboratory Manual, **Cold Spring Harbor Laboratory**, New York, p. 331. 1986
- LASSERRE, A.; CEBRAL, E.; VITULLO, A.D.; Successful capacitation and homologous fertilization *in vitro* in *Calomys musculinus* and *Calomys laucha* (Rodentia – Sigmodontinae). **Journal of Reproduction and Fertility**, 120, 41-47, 2000.
- LARSSON, B.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Can we use *in vitro* fertilization test to predict semen fertility? **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 327-336, 2000.
- MACEDO, M.C.; DESCHAMPS, J.C.; LUCIA, T. Jr. *et al.* *In vitro* penetration of fresh and vitrified swine oocytes by homologous spermatozoa using different incubation systems. **Animal Reproduction Science**. v. 92, p. 334-348, 2006.
- MILLS, J.N.; ELLIS, B.A.; CHILDS, J.E.; MCKEE, K.T.; MAIZTEGUI, J.I.; PETERS, C.J.; KSIAZEK, T.G.; JAHRLING, P.B.; Prevalence of infection with Junin virus in rodent populations in the epidemic area of Argentine hemorrhagic fever **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 51, 554–562, 1994
- NIWA, K.; CHANG, M.C. Optimal sperm concentration and minimum number of spermatozoa for fertilization *in vitro* of rat eggs **Journal of Reproduction and Fertility** 40, 471–474, 1974.
- ROBERTSON, L.; WISHART, G.J. *In vitro* sperm-egg interaction assay utilizing inner perivitelline layer from laid chicken eggs. In: BAKST, M.R.; CECIL, H.C. (Eds.). **Techniques for semen evaluation, semen storage, and fertility determination**. Savoy, IL: Poultry Science Association, Inc. p. 64-67. 1997.
- STATISTIX®. 2003. Statistix® 8 Analytical software. Tallahassee, FL.
- STABENFELDT, G.H.; EDQVIST, L. Processos reprodutivos na fêmea. In: SWENSON, M.J.; REECE, W.O. (Eds.) **Duke's Fisiologia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan S. A. 1996.
- SZTEIN, J.M.; FARLEY, J.S.; MOBRAATEN, L.E. *In Vitro* fertilization with cryopreserved inbred mouse sperm, **Biol. Reprod.** v.63 p.1774-1780. 2000
- TAKEUCHI, Y.; CHO, R.; IWATA, Y.; NISHIMURA, K.; KATO, T., AOKI, K. Morphological and biochemical changes of isolated chicken egg-envelope during

sperm penetration: degradation of the 97-kilodalton glycoprotein is involved in sperm-driven hole formation on the egg envelope. **Biology of Reproduction**, v. 64, p 822-830, 2001.

WASSARMAN, P.M. Mammalian fertilization: Molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis, and fusion. **Cell**. v. 96, p. 175-183, 1999.