

VIABILIDADE DO USO DA MEMBRANA PERIVITELINA INTERNA DO OVO DA GALINHA SOBRE A CAPACIDADE FECUNDANTE DO ESPERMATOZÓIDE SUÍNO

**OLIVEIRA, Érica Ferri¹; CORCINI, Carine Dahl¹;
MOREIRA, Fabiana¹; BONGALHARDO, Denise Calisto, LUCIA, Thomaz JR.¹**

¹ Grupo de pesquisa ReproPel - PigPel - Faculdade de Veterinária – UFPel
E-mail: erica.ferri@hotmail.com
Site: <http://www.ufpel.edu.br/fvet/repropel-pigpel/>

1 INTRODUÇÃO

A avaliação da qualidade seminal *in vitro* de machos suínos se baseia na concentração, motilidade e morfologia espermática como indicativo do potencial de fertilidade do mesmo (Pantke, 1995). Entende-se que para uma avaliação mais criteriosa do reprodutor, tem-se a necessidade de utilizar métodos que avaliam a capacidade do espermatozóide no processo de fecundação, tais como o teste de ligação a zona pelúcida (ZP) (Collins *et al.*, 2008).

Como o número de espermatozóides acessórios na fecundação *in vivo* tem maior correlação com a fertilidade que com a taxa de fecundação (Stahlberg *et al.*, 2000), teste que confirmam a capacidade dos espermatozóides completarem a ligação com a zona pelúcida (ZP) são necessários para a adequada seleção dos machos (Corcini, 2010).

Ensaio de ligação a ZP *in vitro* podem ser utilizados como ferramenta para determinar a habilidade do espermatozóide em sofrer a reação acrossomal, ligar a ZP e penetrar na membrana do oócito (oolema) (Brackett *et al.*, 1982). Deste modo, a visualização de pontos de hidrólise provocados por espermatozóides de mamíferos em membrana perivitelina de ovos de galinha (Barbato *et al.*, 1998) pode ser uma alternativa adequada.

Os testes de ligação/penetração espermática em oócitos suínos são realizados em diferentes meios, porém até o momento sempre foram dependentes de estufas com atmosfera controlada (5% CO₂) (Zhao *et al.*, 2002).

Este experimento teve por objetivo determinar a viabilidade do uso de membranas perivitelinas internas de ovos de galinha (IPVL) na avaliação da capacidade fecundante de espermatozóides suínos com uso de meio Tris modificado (mTBM) sem acondicionamento atmosférico.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas doses de 24 machos (de raça híbrida ou pura) através do método da mão enluvada por um período de três meses em uma central de inseminação artificial (CIA). A cada semana os ejaculados de quatro machos (A, B, C e D) foram usados na constituição de doses inseminantes diluídas em Beltsville Thawing Solution – BTS (Pursel & Johnson, 1975) e armazenadas a 17°C para envio ao laboratório. Doze horas após a coleta procederam-se as avaliações seminais, e somente ejaculados que apresentaram motilidade progressiva \geq a 70%, vigor \geq a 3 e morfologia espermática \geq 80%, participaram deste experimento. Após, foram formados seis grupos com a combinação de dois machos (AB, AC, AD, BC, BD e

CD) contribuindo com a mesma concentração espermática cada. Duas amostras de cada grupo foram centrifugadas a 900 G por três minutos e os pellets foram rediluídos em meio mTBM (mTBM, Abeydeera e Day, 1997), antes de serem utilizados nos testes de penetração *in vitro* (PIV) ou ligação a IPVL.

Para realização da penetração *in vitro* (PIV) foram coletados ovários de fêmeas suínas pré-púberes em um frigorífico local, seguido pela aspiração dos folículos antrais (3-6 mm) realizada com uma agulha conectada ao sistema a vácuo. Em PBS foram selecionados cumulus oophorus compactos e ooplasma homogêneo. Os oócitos foram armazenados por 1 hora em pool, sendo distribuídos entre as combinações de espermatozóides.

Posteriormente, os oócitos foram incubados em banho Maria, juntamente com os espermatozóides em tubos de reação de fundo cônico, contendo 2 mL de meio mTBM. Em cada tubo foram depositados 20 oócitos e 1×10^6 espermatozóides. Através de pipetagem em meio PBS, removeram-se os espermatozóides não aderidos e os oócitos foram tratados com corante Hoescht 33342 e analisados em microscopia de epifluorescência (10x40). Registrou-se o número de oócitos que apresentavam ao menos um espermatozóide aderido bem como o número de espermatozóides aderidos em cada oócito.

Para obtenção das IPVLs foram utilizadas gemas de ovos de galinha não fecundados, incubadas em ácido clorídrico 0,01M e a seguir procedeu-se o isolamento das IPVLs mediante ruptura da gema e eliminação de vitelo em NaCl 0,9% (Robertson e Wishart, 1997). As membranas externa e interna foram separadas manualmente, e distribuídas entre as combinações de sêmen, para utilização nos testes de ligação espermática. Incubou-se espermatozóides com dois fragmentos de IPVL, conforme procedimentos descritos realizados com os oócitos e após as IPVLs foram lavadas com PBS para remoção dos espermatozóides após avaliadas sob contraste de fase (10x20). Em cada fragmento de IPVL foram fotografados três campos microscópicos distintos, com base nos quais foi determinado o número médio de pontos de hidrólise enzimática (orifícios / mm^2).

Foram realizadas doze rotinas com utilização de 72 combinações espermáticas para a incubação com oócitos suínos ($n=2880$) e IPVL ($n=288$ fragmentos).

As taxas de PIV e IPVL foram submetidas a análise descritiva inferindo os resultados em percentual.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No teste de PIV, 2010 oócitos apresentaram ao menos um espermatozóide aderido. Destes, 1171 apresentaram polispermia evidenciando uma taxa média de ligação de $2,7 \pm 0,07$ para o meio mTBM. A taxa de PIV foi de 86,2% e de 71,6% para penetração e polispermia, respectivamente. O número de orifícios observados na IPVL foi de $238,4 \pm 8,46$.

Com estes resultados foi demonstrado que o meio mTBM suporta o processo de capacitação e ligação espermática em ZP de oócitos suínos, mostrando a possibilidade do uso do teste de penetração espermática para ranqueamento de machos suínos nas CIAs. A incorporação desta tecnologia seria facilitada em grande parte pelo fato de dispensar o uso de estufas de acondicionamento atmosférico e de microscópio de fluorescência, convencionalmente utilizado em meios de cultivo como mTBM conforme descrito por (Abeydeera *et al.*, 1997).

No teste de IPVL foi observado um grande número de orifícios formados na membrana interna do ovo de galinha, sendo assim é possível estimar que exista uma menor subjetividade que o teste de PIV. Esta atribuição é sustentada pelo fato de que o orifício na IPVL é gerado por espermatozóides que sofreram capacitação, reação acrossomal, fusão das membranas espermáticas e hidrólise da IPVL (Robertson, *et al.*, 2000). Além disso, a IPVL é composta por proteínas ZP3 com homologia às proteínas ZPb-ZPc (Mugnier *et al.*, 2009), podendo se esperar que haja uma alta correlação entre o número de orifícios/mm² de IPVL e a capacidade fecundante dos espermatozóides suínos *in vivo*. A possibilidade de visualização direta dos pontos de hidrólise (orifícios) sob microscopia de campo escuro (Robertson e Wishart, 1997) ou de contraste de fase (neste estudo) facilita a adoção da técnica de testes de ligação a IPVL em CIAs.

4 CONCLUSÃO

O teste de penetração em IPVL utilizando o meio mTBM, permite avaliar maior número de etapas do processo de interação espermatozóide/oócito do que o teste de adesão espermática em ZP de oócitos suínos.

5 AGRADECIMENTOS

A CAPES pela bolsa de doutorado do primeiro autor e ao CNPQ pela bolsa de produtividade científica da segunda autora.

6 REFERÊNCIAS

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

BARBATO, G.F.; CRAMER, P.G.; HAMMERSTEDT, R.H. A practical *in vitro* sperm-egg binding assay that detects subfertile males. *Biology of Reproduction* 1998; 58: 686-699.

BRACKETT, B.G.; COFONE, M.A.; OICE.M.L.; BOUSQUET,D. Use of zona-free hamster ova to asses sperm fertilizing ability of bull e stallion. *Gamete. Res* 5:217-227, 1982.

COLLINS E.D.; FLOWERS W.L.; SHANKS R.D.; MILLER D.J.; Porcine sperm-zona binding ability as an indicator of fertility. *Animal Reproduction Science* 2008; 104: 69-82.

CORCINI, C.D. Estudo de testes *in vitro* para a predição de fertilidade de machos mamíferos. Pelotas, 2010. 1:96 p. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Pelotas, RS, BRASIL.

MUGNIER S.; AQUILA M,E,D.; PEALEZ J.; DOUET C.; AMBRUOSI B.; SANTIS T.D.; LACALANDRA G.M.; LEBOS C.; SIZARET P.Y.; DELALEU B.; MONGET P.; Mermillod P, Magistrini M, Meyers SA, Goudet G. New insights into the mechanisms of fertilization: comparison of the fertilization steps, the composition, and the structure of the zona pellucid between horses and pigs. *Biology of Reproduction* 2009; 81: 856-870.

PANTKE, P.; HYLE , J.K.; GALLOWAY, D.B.; LIU, D.Y.; BAKER, H.W.G. Development of a zona pellucida-sperm binding assay for the assesment of stallion fertility. *Biology of Reproduction Monograph Series* 1:681-687, 1995.

PURSEL V.G.; JOHNSON L.A.; Freezing of boar spermatozoa: Freezing 292 capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *Journal Animal Science* 1975; 40: 99-102.

ROBERTSON L, WISHART G.J. In vitro sperm-egg interaction assay utilizing inner perivitelline layer from laid chicken eggs. In: Bakst MR, Cecil HC. (Eds.). *Techniques for semen evaluation, semen storage, and fertility determination*. Savoy, IL: Poultry Science Association, Inc. 1997: 64-67.

ROBERTSON L.; WISHART G.J.; HORROCKS A.J. Identification of perivitelline N-linked glycahs as mediators of sperm-egg interaction in chickens. *Journal of Reproduction and Fertility* 2000; 120: 397-403.

STAHLBERG R.; HARLIZIUS 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* 2000; 53: 1365-1373.

ZHAO X.M.; SONG X.X.; KAWAI ; NIWA K. Penetration in vitro of zona-free pig oocytes by homologous and heterologous spermatozoa. *Theriogenology* 2002; 58: 995-1006.