

EFEITO DE DIFERENTES TEMPOS DE INCUBAÇÃO SOBRE A CAPACIDADE DE PENETRAÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES SUÍNOS NA MEMBRANA PERIVITELINA INTERNA DE OVOS DE GALINHA.

GHELLER, Stela Mari Meneghelo¹; CORCINI Carine Dahl¹; BRIZOLARA Rosa Marani Rodrigues²; BONGALHARDO Denise Calisto³; BIANCHI Ivan².

^{1,2}Grupo de pesquisa ReproPel - PigPel - Faculdade de Veterinária – UFPel

³Laboratório de Biotécnicas da Reprodução de Aves – UFPel

E-mail: stelagheller@hotmail.com

Site: <http://www.ufpel.edu.br/fvet/repropel-pigpel>

1 INTRODUÇÃO

Na cadeia produtiva da suinocultura o acompanhamento da fertilidade e qualidade de machos reprodutores é de suma importância para um bom desempenho econômico e reprodutivo das granjas, pois assegura leitegadas maiores e com carga genética superior. As avaliações convencionais de qualidade espermática (motilidade, concentração e morfologia), apresentam baixa associação com a fertilidade e são sensíveis a variações de características individuais atribuídas aos machos doadores de sêmen (XU *et al.*, 1998; POPWELL & FLOWERS, 2004; MACEDO *et al.*, 2006), podendo assim machos subfêrteis não serem identificados e posteriormente implantados em programas de melhoramento genético comprometendo o desenvolvimento dos plantéis. O potencial fertilizante de suínos pode ser estimado pela capacidade de penetração espermática *in vitro* em ovócitos homólogos (LARSSON & RODRIGUES20 MARTINEZ, 2000; POPWELL & FLOWERS, 2004; MACEDO *et al.*, 2006; 2010) ou pela capacidade de fertilização *in vitro* (PELAEZ *et al.*, 2006). Entretanto, estes testes são relativamente trabalhosos e onerosos, inviabilizando a sua utilização na rotina de centrais de inseminação (CIA), justificando assim o desenvolvimento de outros métodos de avaliação *in vitro*. Uma alternativa para a seleção de reprodutores é o teste de penetração na membrana perivitelina interna (MPI) de ovos de galinha, utilizado para sêmen de galos (ROBERTSON & WISHART, 1997). O objetivo desse trabalho é avaliar a capacidade de fertilização de machos suínos através da penetração de espermatozóides na MPI.

2 METODOLOGIA

As amostras de sêmen avaliadas neste experimento (18 ejaculados) foram coletadas de três machos suínos sexualmente maduros e com fertilidade conhecida, que estavam em rotina de coleta em uma CIA comercial, localizada no município de Pelotas– RS. Após a coleta os ejaculados com motilidade (BEARDEN & FUQUAY, 1997) igual ou superior a 80% foram diluídos em Beltsville Thawing Solution (BTS) na concentração de $3,5 \times 10^9$ espermatozóides/100 ml (PURSEL & JHONSON, 1975). A morfologia espermática foi avaliada segundo o protocolo de HANCOCK & HOVELL, 1959, com a contagem de 200 células em microscopia óptica com contraste de fase. No teste de penetração foram utilizados ovos frescos não férteis para a extração das membranas (ROBERTSON & WISHART, 1997), onde as gemas foram lavadas com solução de NaCl a 1% e incubados em HCl, por

um período de 1h a 37°C. Após a incubação, era extraída das gemas a MPI, posteriormente cortadas em pequenos quadrados e armazenadas em NaCl - Tes até a sua utilização no mesmo dia. Para realização dos testes, colocou-se 750 µl de meio composto por TCM199, 0,91 mM de piruvato, 5,5 mM de glicose, 50 µg/ml de sulfato de estreptomicina e 1,1 µl lactato de cálcio, adicionado como meio de fertilização, acrescido de sêmen em uma concentração final de 1×10^6 espermatozoides/mL. As membranas foram incubadas com os espermatozoides em banho-maria a 39°C por períodos de 5, 10, 15 e 20 minutos sem atmosfera controlada e sem agitação. Após este período, as membranas foram lavadas para a retirada das células espermáticas não aderidas e esticadas sobre uma lâmina que foi observada em microscópio de campo escuro, sob aumento de 200 X, três campos da imagem foram fotografados para a contagem do número de orifícios, representando os pontos de hidrólise na membrana, e calculada a média de orifícios por mm^2 .

Análise estatística descritiva foi aplicada para motilidade e morfologia espermática. Comparações das taxas de penetração na MPI foram feitas pelo teste de qui-quadrado. Todas as análises foram realizadas através do software Statistix (2003).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este estudo foi conduzido com intuito de determinar se espermatozoides suínos são capazes de reagir com a (MPI) do ovo da galinha de maneira similar ao observado com outras espécies. Na avaliação *in vitro* da qualidade seminal, as amostras apresentavam média de motilidade e morfologia espermática normal de $90,0 \pm 5,3\%$ e $94 \pm 2,3\%$, respectivamente.

Com relação aos tempos de incubação o número de orifícios na MPI foram maiores com incubação por 20 min (Tabela 1) em meio utilizado para realização de teste de penetração *in vitro* da espécie suína (MACEDO et al., 2006; 2010).

Tabela 1. Taxa de penetração (TP) e número de orifícios (NO) na membrana perivitelina interna do ovo de galinha de espermatozoides suínos em função do tempo de incubação (n=18 ejaculados).

Incubação (min)	Membrana perivitelina interna	
	TP(%)	NO
5	0 ^c	0,0 ± 0,0 ^c
10	0 ^c	0,0 ± 0,0 ^c
15	50 ^d	0,5 ± 0,7 ^d
20	100 ^a	6,0 ± 2,1 ^a

^{a,b,c} Letras diferentes na coluna indicam diferença estatística significativa (P < 0,005)

No teste de penetração na MPI são avaliados diretamente os orifícios provocados pela ação hidrolítica das enzimas acrossomais, caracterizando o processo de capacitação espermática e reação acrossomal. Outro fator importante a se considerar é que MPI é composta por proteínas ZPb-ZPc com alta homologia com as proteínas ZP3 (Mugnier et al., 2009), podendo-se esperar que haja uma alta correlação entre o número de orifícios/ mm^2 de MPI com a capacidade fecundante

dos espermatozóides suínos *in vivo*. Desta forma o teste de penetração espermática *in vitro* na MPI pode ser considerado eficiente, por refletir não somente a capacidade de adesão do espermatozóide como nos ovócitos, mas também por demonstrar sua habilidade em sofrer a reação acrossomal e hidrolisar a membrana.

O teste de penetração espermática *in vitro* na MPI pode ser considerado uma alternativa para verificar a fertilidade de machos suínos, pois apresenta uma rápida execução e não necessita de equipamentos especializados para sua leitura, sendo economicamente viável. Porém outros estudos devem ser realizados na busca de uma maior correlação desta característica *in vitro* com a fertilidade *in vivo*.

4 CONCLUSÃO

O teste de penetração *in vitro* de espermatozóides suínos na MPI de ovos de galinha pode ser realizado de forma eficiente com o uso do meio com incubação por 20 min para determinar a fertilidade de reprodutores em programas de inseminação artificial.

5 REFERÊNCIAS

BARBATO, G.F. et al. A practical *in vitro* sperm-egg binding assay that detects subfertile males. **Biology of Reproduction**, v. 58, pp. 686-699, 1998.

BEARDEN, H.J.; Fuquay, J.W. Semen evaluation. In: **Applied Animal Reproduction**, Bearden HJ, Fuquay JW (Eds.), 4th Ed. New Jersey: Prentice Hall, 1997, pp.159-170.

HANCOCK, J.L.; HOVELL, G.J.R. The collection of boar semen. **The Veterinary Record** v.71, pp.664 – 665.1959.

LARSSON, B.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Can we use *in vitro* fertilization test to predict semen fertility? **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, pp. 327-336, 2000.

MACEDO M.C. Jr.; et al. *In vitro* penetration of swine oocytes by homologous spermatozoa: distinct systems for gamete's coincubation and oocyte's cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v.117, pp. 295-301, 2010.

MACEDO M.C. Jr.; et al. *In vitro* penetration of swine oocytes by homologous spermatozoa: distinct systems for gamete's coincubation and oocyte's cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v.117, pp. 295-301, 2010.

MUGNIER, S. et al. 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** v.81, pp. 856-870, 2009.

PELAEZ, J.; et al. *In vitro* evaluation of the quality and fertilizing capacity of boar semen frozen in 0.25 ml straws. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 41, pp. 153-161, 2006.

POPWELL, J.M., FLOWERS, W.L. Variability in relationships between semen quality and estimates of *in vitro* fertility in boars. **Animal Reproduction Science**. v. 81, pp. 97–113. 2004.

PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A. Freezing of boar spermatozoa: Freezing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. **Journal Animal Science** v.40, pp.99-102.1975.

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. pp. 64-67. 1997.