

AVALIAÇÃO DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO DA MEMBRANA PERIVITELINA INTERNA DO OVO DE GALINHA À 5°C

TONINI, Camila¹²; GHELLER, Stela Mari Meneghello¹; BONGALHARDO, Denise Calisto²³

¹UFPel, Medicina Veterinária, ²UFPel, Laboratório de Biotécnicas da Reprodução de Aves, ³UFPel, Departamento de Fisiologia e Farmacologia. camy_tonini@hotmail.com

1 INTRODUÇÃO

A escolha de um bom reprodutor irá influenciar tanto no melhoramento genético quanto no aumento do número de descendentes, sendo de importância econômica para a indústria de aves. Tradicionalmente, a seleção dos galos para reprodução é feita através da avaliação do tamanho e da cor da crista e das barbelas, do peso corporal e do comprimento das patas, sendo que estas características físicas não apresentam, necessariamente, correlações com a fertilidade do macho (Rutz *et al.*, 2007). A escolha dos reprodutores pela qualidade do sêmen é uma maneira mais confiável para garantir a boa fertilidade do plantel.

Entre as técnicas laboratoriais para análise de sêmen, o teste de penetração espermática destaca-se por ser um dos mais completos, sendo capaz de identificar diferenças entre o potencial reprodutivo dos machos que não são detectadas por outros testes de rotina, como motilidade, morfologia e integridade de membrana (Wishart, 1995). Para a realização deste teste em aves, a membrana perivitelina interna (IPVL) é isolada de ovos frescos e incubada com sêmen; a análise da qualidade do sêmen é estimada através da contagem do número de furos feitos pelos espermatozóides na membrana: quanto maior o número de furos, maior a qualidade seminal (Robertson e Wishart, 2010).

O teste de penetração é uma ferramenta valiosa para avaliar o potencial fertilizante do sêmen, visto que o número de furos depende da habilidade do espermatozóide em se ligar ao ovo, o que desencadeia a reação acrossomal e a liberação de enzimas que hidrolizam a membrana, permitindo a penetração espermática (Donoghue, 1999). Conforme o protocolo para o teste de penetração espermática usando a membrana perivitelina interna do ovo de galinha (IPVL) (Robertson e Wishart, 2010), a membrana deve ser usada no máximo 24 horas após o isolamento. Não existem referências sobre a viabilidade da membrana após este prazo. A possibilidade de uso da membrana após vários dias de armazenamento facilitará a rotina do laboratório. Portanto, este trabalho teve por objetivo determinar o número de dias que a membrana perivitelina interna pode ser armazenada à 5 °C em NaCl-TES.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

No primeiro dia de experimento, a IPVL foi isolada de 18 ovos, frescos e não férteis, por hidrólise ácida, e cortada em quadrados de 0,5 x 0,5 cm (Bongalhardo *et al.*, 2009). As membranas de cada ovo foram identificadas e armazenadas na geladeira, à 5°C, em NaCl-TES. O teste de penetração espermática foi realizado às 24, 48, 72 e 96 horas após isolamento das membranas, segundo protocolo de

Robertson e Wishart (2010). Cada quadrado de membrana foi incubado por 5 min com sêmen diluído na concentração final de $1,25 \times 10^7$ espermatozoides/mL, em banho Maria à 40°C com agitação. Após incubação, as membranas foram lavadas com NaCl para remoção dos espermatozoides, colocadas em lâminas, coradas com eosina-nigrosina e observadas ao microscópio (aumento de 100x) para contagem dos furos. A membrana aparece corada de rosa e os furos são visualizados como pontos brancos e redondos (Fig. 1).

O sêmen utilizado para os testes foi coletado diariamente de 20 galos. Após a coleta, foi feito um *pool* do sêmen não contaminado com fezes e foram verificadas motilidade e concentração espermática. Para análise de motilidade, o sêmen foi diluído com 0,9% NaCl e observado ao microscópio (aumento de 100x), sendo feita avaliação subjetiva usando uma escala de 0 à 100%. A concentração foi verificada em espectrofotômetro previamente calibrado, utilizando sêmen diluído 1:1000 (vol:vol) em 2,9% citrato de sódio com glutaraldeído.



Figura 1 – Membrana perivitelina interna de ovo de galinha, corada com eosina-nigrosina, após teste de penetração espermática e armazenamento da membrana refrigerada à 5°C por 48h. Os furos aparecem como pontos brancos e redondos (aumento de 100x).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 18 ovos que foram incubados para a realização do experimento, foram obtidas membranas de 16. No primeiro dia de teste (24h de armazenamento), 15 ovos apresentaram uma grande quantidade de furos na membrana (mais de 500/mm²), apenas um não apresentou furos. No segundo dia de experimento (48h de armazenamento), apenas cinco ovos apresentaram furos na membrana, sendo que destes, o ovo identificado como número 13 foi o único que repetiu o resultado do dia anterior, apresentando mais de 500 furos (Fig. 1). Nos outros ovos, identificados como número 5, 6, 7 e 10, o número de furos foi de 22, 19, 23 e 29/mm², respectivamente. Nestes ovos, a distribuição dos furos não foi homogênea, com alguns locais da membrana apresentando poucos furos e outros, nenhum. Esta redução drástica às 48h, tanto do número de furos quanto do número de membranas perfuradas, demonstraram que não é possível utilizar a membrana após este período de armazenamento, portanto os testes não foram repetidos às 72 e 96h.

Para que o teste de penetração espermática seja efetivo, tanto a membrana do espermatozóide quanto a membrana do ovo devem estar estruturalmente intactas. Embora não tenham sido feitos testes de integridade de membrana espermática, a diminuição do número de furos observada neste trabalho não deve ser atribuída ao espermatozóide, visto que o sêmen fresco normalmente apresenta boa integridade de membrana, com valores por volta de 90 à 95% (Bakst, 2010). Além disso, a motilidade do espermatozóide foi semelhante nos dois dias de testes, com 70% e 80% de motilidade às 24 e 48h, respectivamente. Portanto, a falha na interação espermatozóide:ovo deve estar associada à estrutura da membrana perivitelina interna do ovo.

A IPVL de aves possui receptores para ligação do espermatozóide, homólogos às glicoproteínas de ligação da zona pelúcida de mamíferos (Mori e Masuda, 1993; Takeuchi *et al.*, 1999; Stepinska e Bakst, 2007). A ligação do espermatozóide à estas glicoproteínas desencadeia os eventos que levam à fertilização: ocorre a reação acrossomal, com a liberação de enzimas que vão hidrolizar a membrana e permitir a penetração do espermatozóide (Ashizawa *et al.*, 2006). Provavelmente a membrana armazenada por mais de 24h sofra alterações em sua estrutura, com a perda dos carboidratos de ligação, impedindo a ocorrência da interação espermatozóide:ovo.

4 CONCLUSÃO

Há uma redução drástica no número de furos feitos pelos espermatozóides na membrana perivitelina interna do ovo após 48 horas de armazenamento, não sendo recomendado o seu uso em testes de penetração espermática após este período.

5 REFERÊNCIAS

- ASHIZAWA, K.; WISHART, G. J.; KATAYAMA, S.; TAKANO, D.; RANASINGHE, A. R. A. H.; NARUMI, K.; TSUZUKI, Y. Regulation of acrosome reaction of fowl spermatozoa: evidence for the involvement of protein kinase C and protein phosphatase-type 1 and/or -type 2A. **Reproduction**, v.131, p.1017-1024, 2006.
- BAKST, M. R., 2010. Nigrosin/Eosin stain for determining live/dead and abnormal counts. In: BAKST, M. R.; LONG, J. A. (eds.) **Techniques for Semen Evaluation, Semen Storage and Fertility Determination**, 2nd ed. Buffalo, MN: The Midwest Poultry Federation, 2010. Chapter III. Sperm Viability. Section 1, p.28-34.
- BONGALHARDO, D. C.; FLORES, A. S.; SEVERO, V.; GONZALEZ, V. C.; MIRANDA, R. C.; CORCINI, C. D.; CURCIO, B. R.; COSTA, S. M. L. C.; DESCHAMPS, J. C. Vitrification of the inner perivitelline layer of chicken eggs for use in the sperm-egg interaction assay. **Theriogenology**, v.72, p.198-202, 2009.
- DONOGHUE, A. M. Prospective approaches to avoid flock fertility problems: predictive assessment of sperm function traits in poultry. **Poultry Science**, v.78, p.437-443, 1999.
- MORI, M.; MASUDA, N. Proteins of the vitelline membrane of quail (*Coturnix coturnix japonica*) eggs. **Poult Sci**, v.72, p.1566-1572, 1993.

- ROBERTSON, L.; WISHART, G. J. *In vitro* sperm-egg interaction assay utilizing inner perivitelline layer from laid chicken eggs. In: BAKST, M. R.; LONG, J. A. (eds.) **Techniques for Semen Evaluation, Semen Storage and Fertility Determination, 2nd ed.** Buffalo, MN: The Midwest Poultry Federation, 2010. Chapter VIII. Sperm Function Assessment. Section 1, p.95-98.
- RUTZ, F.; ANCIUTI, M.; XAVIER, E.; ROLL, V. Avanços na fisiologia e desempenho reprodutivo de aves domésticas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, nº3, p.307-317, 2007.
- STEPINSKA, U.; BAKST, M. R. Fertilization. In: Jamieson BGM (ed.) **Reproductive Biology and Phylogeny of Aves (Birds)**. Science Publishers, 2007. p.553-587.
- TAKEUCHI, Y.; NISHIMURA, K.; AOKI, N.; ADACHI, T.; SATO, C.; KITAJIMA, K.; MATSUDA, T. A 42-kDa glycoprotein from chicken egg-envelope, an avian homolog of the ZPC family glycoproteins in mammalian Zona pellucida. Its first identification, cDNA cloning and granulosa cell-specific expression. **Eur J Biochem**, v.260, p.736-742, 1999.
- WISHART, G. J. New approaches to evaluating male and female fertility. In: BAKST, M. R.; WISHART, G. J. (eds.) **First international symposium on the artificial insemination of poultry**. The Poultry Science Association, 1995, p. 207-223.