



Comparação entre o teste de penetração *in vitro* e o das membranas perivitelina do ovo da galinha para predizer a fertilidade do macho

CORCINI, Carine Dahl¹; STEPHAN, Mariangela Heppe Lopes²; COLLARES, Elton Pinto²; SANTOS, Elisa Caroline da Silva¹; SCHIAVON, Raquel Schiavon¹; VARELA JUNIOR, Antonio Sergio²; BONGALHARDO, Denise Calisto¹; LUCIA, Thomaz Jr.¹

¹Laboratório de Reprodução Animal- Faculdade de Veterinária – UFPel

²Instituto de Ciências Biológicas - FURG

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

Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS. caca_vet@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

Calomys laucha é um pequeno roedor, encontrado no sul da América latina, que é muito utilizados em estudos de virologia e pesquisas ecológicas, por sua importância epidemiológica como reservatório natural do vírus da hantavirose e de protozoários patogênicos a humanos (Mills *et al.*, 1994; Childs *et al.*, 1995).

Os estudos que visam caracterizar aspectos biológicos da reprodução desta espécie exigem procedimentos rigorosos para determinar a fertilidade do macho, já que, possuem uma facilidade de produção e ninhadas grandes. Por este motivo, é essencial avaliar a motilidade, integridade de membrana, acrossoma e morfologia espermática, assim como a análise de penetração *in vitro* em oócitos.

Um dos métodos testados em *Calomys laucha* é o teste de penetração *in vitro* (PIV) que utiliza oócitos de hamster (Lasserre *et al.*, 2000). A PIV utiliza o meio TALP contendo 4% de albumina sérica bovina (BSA) que propicia a capacitação e a capacidade de se ligar ao oócito (Niwa & Chang, 1974). No entanto o teste de PIV é suscetível aos efeitos da grande variação na capacidade de adesão da célula espermática aos oócitos, o que diminui a exatidão da observação de diferenças entre os machos (Berger *et al.*, 1996; Larsson & Rodríguez-Martínez, 2000). O SBA (Sperm-Binding Assay) é um teste baseado na adesão dos espermatozoides a substrato sintético, já usado para estimativas de fertilidade *in vivo* do sêmen de galos (Barbato *et al.*, 1998), com execução menos trabalhosa, porém exige equipamento especializado para fazer sua leitura.

Em função da limitação dos testes mencionado acima, o potencial fertilizante de diferentes machos poderia ser estimado a partir da adesão e penetração dos seus espermatozoides às membranas perivitelinas externa e interna do ovo da galinha, conforme já utilizado para sêmen de galos, camundongos (Robertson & Wishart, 1997; Barbato *et al.*, 1998), porém ainda não testado com sêmen de *Calomys laucha*. Portanto, espermatozoides com maior capacidade de adesão e penetração nestas membranas apresentariam maior capacidade fertilizante, quando em contato com oócitos heterólogos.

Este trabalho objetivou estabelecer um método para estimar a fertilidade de machos de *Calomys laucha*, a partir da capacidade de adesão e penetração dos

espermatozóides nas membranas perivitelinas do ovo da galinha e comparar com o teste de PIV.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 11 machos do espécime *Calomys laucha*, de fertilidade conhecida, capturados nas dunas costeiras da praia do Cassino, e mantidos no Biotério de animais não convencionais do Instituto de Ciências Biológicas da FURG. Os machos doadores foram sacrificados por deslocamento cervical (Hogan *et al.*, 1986). A abordagem dos testículos foi feita por laparotomia, removendo a cauda do epidídimo e parte do ducto deferente para uma placa de petri de 35 mm de diâmetro (Corning®) contendo 750 µL de M2 (Sigma®). Para coleta do sêmen, realizou-se o rompimento das estruturas anatômicas, com auxílio de agulhas hipodérmicas, para suspensão dos espermatozóides (Sztein *et al.*, 2000).

A coleta de oócitos de suínos e a preparação para o teste de PIV seguiu a metodologia utilizada por Macedo *et al.*, 2006. Para a realização do teste foram utilizados 30 oócitos por macho. Na fertilização utilizou-se uma gota de 750 µL de M2 com HEPES contendo 0,4% de BSA acrescido de 250 µL de sêmen, permanecendo incubada em banho maria por 2 h a 37°C. Após esse período, os oócitos foram recuperados, lavados, submetidos ao corante Hoescht 33342 (10µg/mL) e avaliados em microscópio de epifluorescência sob 400x. O número de oócitos que tiveram espermatozóides em seu interior foi contado, assim como o número de espermatozóides em cada oócito.

Foram usados ovos de galinhas frescos e não férteis. O isolamento das membranas perivitelinas externa e interna, seguiu o protocolo descrito por Robertson & Wishart (1997). Este teste foi realizado em duplicata e seguiu o mesmo meio e protocolo de incubação para fertilização como descrito acima. Após estes períodos, as membranas foram lavadas para retirada dos espermatozóides não aderidos. Na montagem da lâmina da membrana externa (não entendi?), foi adicionado sobre a membrana o corante fluorescente Hoechst 33342 (Sigma®). A avaliação da membrana, ou seja, a contagem dos espermatozóides aderidos, foi realizada sob luz ultravioleta (filtro de excitação BP 330 - 385) no microscópio de epifluorescência (Olympus U-MWV2 - Olympus®, USA). As lâminas da membrana interna foram observadas em microscópio de campo escuro utilizando aumento de 200 X. A penetração espermática foi avaliada através de perfurações na membrana, em 3 campos diferentes na mesma lâmina.

Os dados de taxa de penetração e adesão foram analisados utilizando o teste Qui-quadrado, para o número espermatozóides aderidos na membrana foi utilizado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis. Todas as análises estatísticas foram conduzidas através do *software* Statistix 8.0® (2003).

3. RESULTADO E DISCUSSÃO

Nos mamíferos a zona pellucida que é composta por glicoproteínas, mais especificamente ZP3 e ZPC, tem um papel essencial na ligação do espermatozóide ao oócito (Wassarman, 1999). Estudos realizados por Takeuchi *et al.* (2001) sugerem que a principal proteína (chkZP3) nas membranas interna e externa pode ter função homóloga a ZP3 em oócitos de mamíferos. Neste estudo, que buscou comparar o teste que utiliza oócito contra a utilização das membranas perivitelinas, foi constatado que na comparação da taxa de penetração dos tratamentos utilizados a membrana

interna (62,5%) não diferiu ($P > 0,05$) do oócito (44,9%) e da membrana externa (73,3%), porém, o oócito foi inferior a membrana externa ($P < 0,05$). Lasserre *et al.* (2000), utilizando o meio TALP com 5% de BSA, observaram uma taxa de penetração de 18,4% quando se utilizou oócitos de hamster com espermatozóides da *Calomys laucha*, neste estudo, mesmo utilizando oócitos de suínos e o M2 com 0,4% de BSA, a taxa foi superior.

Quando se comparou a relação de número de espermatozóides aderidos ou penetrados entre os tratamentos utilizados, membrana interna ($2,8 \pm 4,7$) não diferiu ($P > 0,05$) do oócito ($1,1 \pm 1,8$) e da membrana externa ($7,5 \pm 9,2$), porém, o oócito foi inferior a membrana externa ($P < 0,05$). Desta forma, demonstrando que o teste das membranas pode ser utilizado sem que exista percas no resultado de fertilidade *in vitro* de machos.

As taxas de polispermia e penetração espermática *in vitro* (Tabela 1), são afetadas diretamente pelo tratamento utilizado, no teste da membrana este efeito não foi verificado. A variação individual sugere que os machos respondam diferentemente aos tratamentos de fertilização *in vitro*, o que pode ser relacionado com a fertilidade *in vivo*.

Tabela 1- Relação entre tratamento e a porcentagem de ocorrência de polispermia, monospermia e não penetrado com espermatozóides de *Calomys laucha*

Tratamento (n)	Polispermia (%)	Monospermia (%)	Não penetrado (%)
Membrana interna (16)	50	12,5	37,5
Membrana externa (15)	73,3	-	26,7
Oócito (265)	26,8	18,5	54,7

4. CONCLUSÃO

Portanto, neste estudo ficou comprovado que a utilização das membranas perivitelinas do ovo da galinha podem ser utilizadas em substituição da penetração *in vitro* utilizando oócitos, sem perdas na confiabilidade do teste de fertilidade *in vitro*.

5. AGRADECIMENTO

Á CAPES pela bolsa de doutorado do primeiro 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.

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-drive 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.