



AVALIAÇÃO DA FERTILIDADE ESPERMÁTICA DE *Calomys laucha* ATRAVÉS DO TESTE DE PENETRAÇÃO IN VITRO EM OÓCITOS SUÍNOS

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 – UFFPEL

²Instituto de Ciências Biológicas - FURG

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

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

1. INTRODUÇÃO

Os pequenos roedores da espécie *Calomys laucha* são encontrados no sul da Bolívia, sul do Brasil, centro da Argentina e Uruguai, podendo ser avistados em pastagens, áreas agrícolas, margens de estradas e dunas costeiras. Eles apresentam grande importância epidemiológica, pois são hospedeiros naturais de vírus, como os vírus Junin, causador da febre hemorrágica Argentina, do hanta vírus e de protozoários (Lasserre *et al.*, 2000).

Os *Calomys* apresentam diferenças com relação aos aspectos biológicos da reprodução, como o sucesso na biotécnica reprodutiva de fertilização *in vitro*, quando comparado a outras espécies (Lasserre *et al.*, 2000). Sendo assim, são necessários estudos com relação à capacitação espermática, reação acrossômica e subsequente habilidade de penetração à zona pelúcida.

A fertilização consiste em vários eventos, os quais devem ocorrer com eficiência para que o sucesso da concepção. Se o sêmen apresentar alguma anormalidade em algum destes eventos, pode ocorrer redução da fertilidade. Com tudo isso, vários testes laboratoriais podem identificar amostras subférteis e avaliar a capacidade espermática. Como por exemplo, a avaliação da motilidade espermática, morfologia e concentração espermática (Braundmeier & Miller, 2001). No entanto, existem autores que sugerem a utilização de outros métodos para análise da competência funcional do sêmen. Dentro destes, o teste de penetração *in vitro* (PIV) é um teste muito utilizado, pois mede a habilidade do espermatozóide em se fundir a membrana do oócito, sendo que, através deste pode-se avaliar o potencial de fertilidade do sêmen (Braundmeier *et al.*, 2004). Eu falaria de utilizar oócitos de outros animais.

Existem, no entanto, diversos efeitos relacionados com a penetração espermática e a interação entre machos. Em suínos, foram relatadas diferentes interações entre macho e determinados testes (Popweel & Flowers), como também, entre macho e tratamentos (qual tratamento?) (Macedo *et al.*, 2006), o que dificulta o estabelecimento de uma associação entre os resultados dos testes e uma real capacidade fertilizante *in vivo*.

Este trabalho teve como objetivo estimar a fertilidade de machos de *Calomys laucha*, a partir da comparação da capacidade de penetração dos espermatozóides de *Calomys laucha* em oócitos suínos com os testes de motilidade, integridade de membrana e integridade do acrossoma.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Coleta de sêmen

Os animais utilizados da espécie *Calomys laucha* foram capturados nas dunas costeiras da praia do Cassino, e mantidos no Biotério de animais não convencionais do Instituto de Ciências Biológicas da FURG. Foram utilizados 9 machos de fertilidade conhecida, os quais foram sacrificados através de deslocamento cervical (Hogan *et al.*, 1986). Os testículos foram retirados através de laparotomia, sendo removidos a cauda do epidídimo e parte do ducto deferente para uma placa de petri de 35 mm (Corning®), em gota de 750 µl de M2 (Sigma®). O sêmen foi coletado através do rompimento das estruturas anatômicas com auxílio de agulhas hipodérmicas, ocorrendo a suspensão dos espermatozóides (Sztejn *et al.*, 2000), sendo que, logo após a coleta foram avaliados a motilidade e vigor.

2.1. Coleta dos oócitos

A coleta de oócitos de suínos e a preparação para o teste de PIV foi realizada conforme metodologia descrita por Macedo *et al.*, 2006. Para a realização deste teste foram utilizados 30 oócitos por macho. A fertilização foi realizada em gota de 750 µl de M2 com HEPES contendo 0,4% de BSA acrescido de 250 µl de sêmen, a qual permaneceu em banho-maria durante 2 h em 37 °C. Após esse período, os oócitos foram recuperados, lavados, pipetados 15 vezes com auxílio de pipeta 100 µl, submetidos ao corante Hoescht 33342 (10µg/ml) e avaliados em microscópio de fluorescência sob 400x. Foi avaliado o número de oócitos com espermatozóides em seu interior, assim como, o número de espermatozóides por oócito.

2.3. Avaliação da integridade da membrana espermática

A avaliação da integridade de membrana (IM) espermática foi realizada com sêmen *in natura* (se usa esse termo?) e pós-descongelamento, através das sondas fluorescentes Diacetato de Carboxifluoresceína (CFDA) e Iodeto de Propídio (IP), conforme descrito por Harrison & Vickers (1990). A avaliação foi feita sob aumento de 400x em microscópio de epifluorescência. Foi realizada a contagem de 100 espermatozóides por lâmina. As células espermáticas apresentando fluorescência verde foram consideradas íntegras, enquanto que as células apresentando fluorescência vermelha, ou ambas as cores, foram consideradas danificadas.

2.4. Avaliação da morfologia espermática

A morfologia espermática foi avaliada após a incubação de 10 min a 37 °C, utilizando-se o protocolo descrito por Hancock (1959), em microscópio ótico com contraste de fases, no aumento de 1000X. As células foram coradas com eosina.

2.5 Avaliação da integridade do acrossoma

Esta avaliação foi baseada na técnica descrita por Kawamoto et al. (1999), com modificações. Inicialmente, adicionou-se 20 µL de IP a uma alíquota de 20 µL de sêmen. Posteriormente, as amostras foram mantidas a 24 °C por 3 min e, em seguida, centrifugadas duas vezes a 300 x g por 10 min para retirar todo excesso do IP. O sobrenadante foi desprezado, e o *pellet* resultante foi re-suspenso em 20 µL de PBS (*Phosphate Buffer Saline*) a 1%. A partir dessas amostras, foram confeccionados esfregaços em lâminas. Depois de secas, as lâminas foram submersas em álcool etílico absoluto 95,55% por 5 minutos e depois novamente lavadas em PBS. Em uma sala escura, adicionaram-se às amostras, por 10 minutos, 20 µL de *Lectin from Arachis hypogaea FITC Conjugate* (20 mg/mL). Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água deionizada e drenadas. Após esse procedimento, adicionaram-se 10 µL de solução de Glicerol com PBS (9:1 v/v).

As lâminas foram avaliadas sob aumento de 1000x em microscópio de epifluorescência, através de excitação em filtro WU com excitações de 450-490 nm e emissão 520 nm. Após a contagem de 100 espermatozoides por lâmina, foram consideradas células com acrossomas íntegros aquelas que apresentavam fluorescência verde no acrossoma. Quando toda a cabeça da célula era corada de vermelho (indicativa de acúmulo de IP) e a coloração verde não era aparente, o acrossoma foi considerado danificado. (eu colocaria só as modificações que foram realizadas na técnica!)

Os ejaculados foram classificados como bom quando tinha motilidade $\geq 80\%$, integridade de membrana espermática $\geq 80\%$ e acrossoma íntegro $\geq 60\%$ e ruim quando não apresentavam esses parâmetros. A análise estatística foi feita utilizando ANOVA e correlação de Pearson (Statistix 8.0).

3. RESULTADO E DISCUSSÃO

Foram considerados como oócitos penetrados aqueles que apresentaram no seu interior a descondensação da cabeça do espermatozoide. No presente estudo, a média de penetração em oócitos suínos foi de 40,5%. Enquanto que, Lassere *et al.* (2000) obtiveram em média 18,4% de penetração espermática, quando foram utilizados oócitos de hamster. Houve correlação significativa ($P < 0,05$) entre a integridade de membrana espermática e a taxa de penetração ($r = 0,45$), quanto ao número de espermatozoide penetrados e a membrana íntegra do espermatozoide ($r = 0,49$). Esta correlação demonstrou que a integridade de membrana espermática é um bom indicador de fertilidade para machos *Calomys laucha*, utilizando o meio M2. Não houve correlação significativa ($P > 0,05$) entre motilidade, taxa de penetração e acrossoma.

Na taxa de penetração foi observado que, o ejaculado considerado bom, de acordo com as características de acrossoma íntegro e de membrana íntegra, apresentou uma maior taxa de penetração ($P < 0,05$), quando comparado com o ruim, porém o mesmo não foi observado para a característica de motilidade ($P > 0,05$) (Tabela 1)

Tabela 1- Motilidade, integridade de membrana e integridade de acrosoma em função da categorização do ejaculado de *Calomys laucha* quando relacionado a taxa de penetração.

Ejaculado	Motilidade (%)	Integridade de membrana (%)	Acrossoma íntegro (%)
Bom	45,0±11,0 ^a	66,1±28,6 ^a	51,2±25,7 ^a
Ruim	30,2±11,0 ^a	32,0±15,0 ^b	27,5±13,4 ^b

Média± EPM com expoente diferentes na coluna diferem por $P < 0,05$.

Bom= motilidade \geq 80%, integridade de membrana espermática \geq 80% e acrossoma integro \geq 60%; Ruim o contrário do Bom.

4. CONCLUSÃO

A avaliação *in vitro* da integridade de membrana pode ser utilizada como indicador de fertilidade *in vitro* para machos da espécie *Calomys laucha* quando o sêmen for coletado utilizando o meio M2.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRAUNDMEIER, A. G.; DEMERS, J. M.; SHANKS, R. D.; MILLER, D. J. The relationship of porcine sperm zona-binding ability to fertility. **Journal of Animal Science**. v. 82, p. 452-458, 2004.
- BRAUNDMEIER, A. G.; AND MILLER, D. J. The search is on: Finding accurate molecular markers of male fertility. **J. Dairy. Sci.** v. 84, p. 1915-1925, 2001.
- HANCOCK, J.L., HOVELL, G.J.R. The collection of boar semen. **Veterinary Record** 71, 664 – 665, 1959.
- HARRISON, R.A.P., VICKERS, S.E. 1990. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal Reproduction and Fertility** 88, 343 – 352.
- HOGAN, B.; CONSTANTINI, F.; LACY, E.; Manipulating the mouse embryo:A Laboratory Manual, **Cold Spring Harbor Laboratory**, New York, p. 331. 1986
- KAWAMOTO, A., KAZUTOMO, O., KISHIKAWA, H., ZHU, L., AZUMA, C., MURATA, Y., 1999. Two-color fluorescence staining of lectin and anti-CD46 antibody to assess acrosomal status. **Fertility and Sterility** 71, 497 – 501.
- 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**, v. 120, p. 41-47, 2000.
- MACEDO, JR. M. C.; DESCHAMPS, J. C.; LUCIA, JR. T.; BORDIGNON, J.; SERRET, C.; RAMBO, G.; PIVATO, I.; SCHMITT, E. In vitro penetration of fresh and vitrified swine oocytes by homologous spermatozoa using different incubations systems. **Animal Reproduction Science**, v. 92, p. 334-348, 2006.
- POPWELL, J. M.; FLOWERS, W. L. Variability in relationships between semen quality and estimates of in vivo and in vitro fertility in boars. **Animal Reproduction Science**, v. 81, p. 91-113, 2004.
- 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
- Falta referencia do statistix!