



## Teste de ligação de espermatozoides de suínos da raça Piau à membrana perivitelina da gema do ovo

*Sperm-binding assay in Piau swine breeds to the hen's egg perivitelline membrane*

R.O. Pinho<sup>1,5</sup>, H.H. Shiomi<sup>2</sup>, D.M.A. Lima<sup>3</sup>, E.V. Costa<sup>1</sup>, M.C.R. Santos<sup>1</sup>, P.S. Lopes<sup>1</sup>, S.E.F. Guimarães<sup>1,4</sup>, J.D. Guimarães<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa (DZO/UFV), Viçosa, MG, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Veterinária (DVT/UFV), Viçosa, MG, Brasil.

<sup>3</sup>Departamento de Veterinária, Universidade de Viçosa (UNIVIÇOSA), Viçosa, MG, Brasil.

<sup>4</sup>Coordenadores do projeto

<sup>5</sup>Correspondência: rogerio\_op@yahoo.com.br

### Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar a utilização do teste de ligação de espermatozoides à membrana perivitelina da gema do ovo de galinha como uma alternativa de prever a qualidade espermática pós-descongelamento em suínos da raça Piau. Foram utilizadas cinco partidas de sêmen congelado de um varrão, as quais foram subdivididas em quatro tratamentos, de acordo com o meio (BTS ou B-TALP) e as concentrações espermáticas utilizadas (20 ou 40 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/mL). Além disso, utilizaram-se 25 partidas de sêmen congelado de cinco varrões (cinco partidas de cada animal), sendo que 10 µL de sêmen na concentração de 20 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/mL foram incubados em meio BTS ou B-TALP. No experimento 1, o número médio de espermatozoides aderidos/mm<sup>2</sup> variou de 157,0 ± 81,3 a 249,4 ± 119,3 (P > 0,05). No experimento 2, o número médio de espermatozoides ligados/mm<sup>2</sup> foi de 339,3 ± 255,5 e 275,4 ± 164,0, respectivamente, para os meios BTS e B-TALP, sem diferença entre eles (P > 0,05). Concluiu-se que a concentração espermática, assim como os meios de incubação utilizados, não interferiu na capacidade de adesão de espermatozoides à membrana perivitelina da gema do ovo em animais da raça Piau.

**Palavras-chave:** B-TALP, BTS, sêmen, varrões.

### Abstract

*The objective of this study was to verify the use of sperm-binding assay in Piau swine breeds to the hen's egg perivitelline membrane as an alternative to predict semen post-thawing fertilizing capability. It were used five matches of frozen semen from a boar, and the matches divided into four treatments, according to media (BTS or B-TALP) or sperm concentration (20 or 40 x 10<sup>6</sup> sperm/ml). Moreover, Twenty five frozen semen samples were used from five males (five semen samples from each male), using 10 µL of sperm with the concentration of 20 x 10<sup>6</sup> spermatozoa/mL and incubated BTS or B-TALP. In experiment 1, the average number of sperm-binding/mm<sup>2</sup> varied from 157.0 ± 81.3 to 249.4 ± 119.3 (P > 0.05). In experiment two, The average number of sperm-binding/mm<sup>2</sup> was 339.3 ± 255.5 and 275.4 ± 164.0, respectively for BTS and B-TALP media, with no difference between themselves (P > 0.05). It was concluded that sperm concentration, as well as the incubation media used did not affect the sperm adhesion to hen's egg perivitelline membrane in Piau breed animals.*

**Keywords:** boars, B-TALP, BTS, semen.

### Introdução

A formação da raça Piau remonta aos suínos de origem chinesa, introduzidos no Brasil pelos portugueses durante o período de colonização, e a outras raças estrangeiras originárias das regiões de migração europeia (Schreiner, 1987).

Entre as raças suínas catalogadas como de alto risco de extinção, apenas a raça Piau ainda existe, portanto a manutenção das chamadas raças naturalizadas de suínos é imprescindível, visto que tais raças apresentam características próprias de adaptação aos ecossistemas brasileiros, além de constituírem fontes potenciais de novas variantes genéticas de importância para a suinocultura nacional (Sollero et al., 2009). Sendo assim, pesquisas em criopreservação de sêmen de suínos da raça Piau são fundamentais.

A avaliação da motilidade espermática é o parâmetro mais utilizado para a avaliação do sêmen e, após a criopreservação deste, tem como objetivo verificar a proporção de espermatozoides que mantiveram a capacidade de movimentação após as injúrias causadas por esse processo (Peña e Linde-Forsberg, 2000).



As avaliações de qualidade seminal por meio de métodos convencionais (motilidade, vigor e morfologia espermática) apresentam limitada capacidade para identificar diferenças de menor magnitude entre machos com potencial de fertilidade mais homogênea (Gadea, 2005). Portanto, existe a necessidade de desenvolvimento de métodos *in vitro* eficientes no diagnóstico do potencial fertilizante dos machos (Corcini, 2010).

A capacidade fecundante dos espermatozoides de suínos pode ser avaliada pelo teste de ligação ao oócito. O teste de penetração *in vitro* (PIV) em oócitos simula os processos envolvidos no mecanismo de fertilização (Bernardi, 2008), podendo também ser baseado na capacidade de ligação de espermatozoides à membrana perivitelina do ovo de galinha, simulando a interação dos gametas (Corcini, 2010). Segundo Corcini et al. (2012), esse teste é considerado mais eficiente para verificar a habilidade dos espermatozoides em sofrer a reação acrossomal. De acordo com Barbato et al. (1998) e Mugnier et al. (2009), similaridades entre as glicoproteínas da zona pelúcida e da membrana perivitelina da gema de ovo de galinha permitem a ligação dos espermatozoides de outras espécies a essa membrana.

A execução do teste de PIV necessita da obtenção de oócitos frescos, uma vez que, após a estocagem de oócitos por períodos superiores a 24 h, a capacidade de PIV de espermatozoides suínos é reduzida (Macedo et al., 2006, 2010). As limitações mencionadas acima justificam a avaliação de outros métodos *in vitro* e também de métodos alternativos para o acondicionamento de gametas femininos. Com esse intuito, o teste de PIV na membrana perivitelina interna do ovo da galinha já foi usado para sêmen de galos (Robertson e Wishart, 1997; Robertson et al., 1997), de humanos e de outras espécies mamíferas (Barbato et al., 1998), porém testado primeiramente em suínos por Corcini (2010).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a utilização do teste de ligação de espermatozoides à membrana perivitelina interna da gema do ovo de galinha como uma alternativa de predizer a qualidade espermática pós-descongelamento.

## Material e Métodos

### *Processamento e criopreservação*

A fração rica do sêmen foi diluída 1:1 (v:v) em meio Beltsville thawing solution (BTS) e mantida à temperatura de 25°C por 60 min. Posteriormente, foi resfriada a 15°C por 60 min e, ao final desse período, centrifugada a 800 G por 10 min.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e os espermatozoides do *pellet* foram ressuspensos em diluente de resfriamento (80% de solução de  $\beta$ -lactose, 20% de gema de ovo e 100  $\mu$ g/mL de sulfato de canamicina). O *pellet* ressuspensionado foi mantido a 5°C por 90 min e, após esse período, foi adicionado o diluente de congelamento (72,5% de lactose a 11%, 20% de gema de ovo, 6% de glicerol e 1,5% de Orvus-es-paste), até atingir uma concentração final de  $200 \times 10^6$  espermatozoides/palheta. O sêmen foi envasado em palhetas de 0,5 mL e congelado em vapor de nitrogênio (-120°C) por 20 min e, posteriormente, as palhetas foram submersas em nitrogênio líquido.

O descongelamento foi realizado submetendo-se as palhetas à temperatura de 37°C em banho-maria por 20 s, e o sêmen congelado/descongelado foi avaliado por meio da motilidade e do vigor espermático e do teste de ligação dos espermatozoides à membrana perivitelina interna da gema do ovo de galinha.

### *Preparação das membranas*

A membrana perivitelina foi preparada pela separação da gema da clara do ovo, e o excesso de clara removido com um papel-filtro. A gema intacta foi colocada sobre um pedaço de *parafilm*, sendo sua membrana delicadamente rompida e lavada com Bull TALP média (B-TALP). A membrana, então, foi colocada em um frasco de vidro de 10 mL e lavada várias vezes com B-TALP até que a solução estivesse limpa. Posteriormente, foi espalhada delicadamente em uma placa de Petri e cortada em pequenos quadrados (1 x 1 cm) usando-se uma cubeta de espectrofotômetro como modelo, sendo cada pedaço colocado em um tubo de cultura (16 x 100 mm) contendo o meio de incubação.

### *Experimento 1*

Foram utilizadas cinco partidas de sêmen congelado de um varrão da raça Piau, apto à reprodução pelo exame andrológico. As partidas de sêmen foram subdivididas em quatro tratamentos: T1 (cada quadrado da membrana perivitelina foi inseminado com 10  $\mu$ L de sêmen na concentração de  $20 \times 10^6$  espermatozoides/mL e incubado em meio B-TALP); T2 (10  $\mu$ L de sêmen na concentração de  $20 \times 10^6$  espermatozoides/mL incubados em BTS); T3 (10  $\mu$ L de sêmen na concentração de  $40 \times 10^6$  espermatozoides/mL incubados em B-TALP); e T4 (10  $\mu$ L de sêmen na concentração de  $40 \times 10^6$  espermatozoides/mL incubados em BTS), a fim de se avaliar o efeito da concentração espermática, na presença de B-TALP ou BTS sobre a capacidade de ligação dos espermatozoides à membrana perivitelina interna da gema do ovo de galinha.

As membranas com os espermatozoides foram incubadas por uma hora a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO<sup>2</sup>. Meia hora antes do final da incubação, acrescentou-se 1 µL de Hoechst 33342 (1 mg/mL de água) para corar o núcleo dos espermatozoides. Depois da incubação, cada membrana foi colocada em um tubo contendo 1 mL de B-TALP e as membranas foram lavadas cinco vezes.

Cada membrana foi, então, colocada sobre uma lâmina e delicadamente espalhada sobre esta para serem removidas possíveis dobras. As lâminas foram cobertas com lamínulas e examinadas utilizando-se um microscópio de epifluorescência equipado com filtros de excitação (365 nm) e barreira (410 nm) sob aumento de 400x, observando-se os núcleos dos espermatozoides aderidos à membrana.

Para cada amostra foram contados todos os espermatozoides que estavam aderidos à membrana em seis microcampos, estimando-se o percentual de espermatozoides aderidos segundo Barbato et al. (1998).

### Experimento 2

Foram utilizadas 25 partidas de sêmen congelado de cinco varrões da raça Piau (cinco partidas de cada animal), a fim de se estudar a variabilidade entre animais. Neste experimento, foram utilizados 10 µL de sêmen na concentração de 20 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/mL incubados nos meios BTS e B-TALP. Os demais procedimentos foram semelhantes ao experimento 1.

### Análises estatísticas

Os dados obtidos foram arranjos de forma fatorial com duas concentrações espermáticas e dois meios de incubação. Testou-se a interação entre as concentrações espermáticas e os meios de incubação; posteriormente, os dados foram submetidos à análise de variância e aos testes de Kruskal Wallis e de Tukey a 5% de probabilidade de erro para as comparações de médias. Foram realizados, ainda, os testes de normalidade (Lilliefors) e homogeneidade das variâncias (Cochran e Bartlett).

## Resultados e Discussão

### Experimento 1

A média de motilidade progressiva e a de vigor espermático para as partidas avaliadas foram de 42,0 ± 2,5 e 3,0 ± 0,0, respectivamente. O número médio de espermatozoides aderidos/mm<sup>2</sup> (Fig. 1) foi de 157,0 ± 81,3; 249,4 ± 119,3; 203,2 ± 114,4 e 245,2 ± 172,1 para os tratamentos T1, T2, T3 e T4, respectivamente (P > 0,05). Já Corcini et al. (2012), utilizando diferentes concentrações de lactato de cálcio no meio de incubação, obtiveram média de 37,5 espermatozoides aderidos, porém em sêmen *in natura* de suínos de linhagens comerciais.

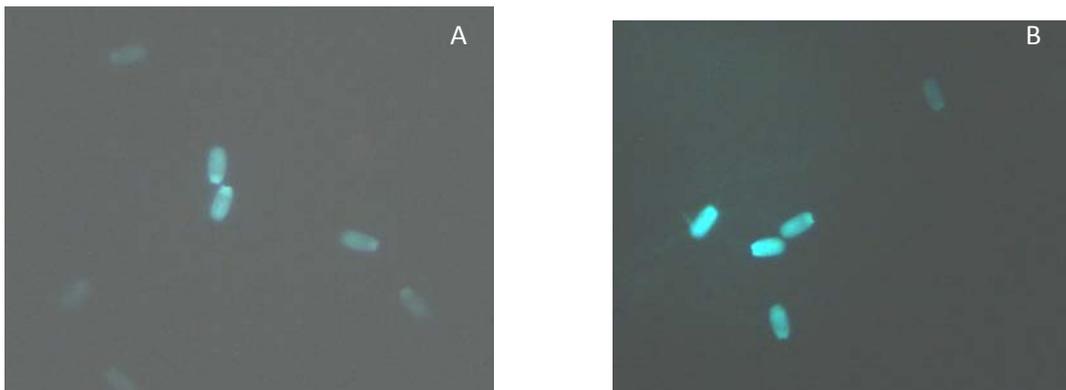


Figura 1. Espermatozoides aderidos à membrana perivitelina interna da gema do ovo, visualizados por meio de sonda fluorescente Hoechst 33342. A) e B) campos com 7 e 5 espermatozoides aderidos, respectivamente.

Também não houve diferença na porcentagem de espermatozoides aderidos à membrana, com taxas de 0,16 ± 0,08; 0,12 ± 0,06; 0,20 ± 0,11 e 0,12 ± 0,08% para os tratamentos T1, T2, T3 e T4, respectivamente (P > 0,05), indicando que não houve variabilidade de acordo com as partidas e os tratamentos avaliados. Percebe-se, portanto, que as partidas possuem o mesmo potencial de ligação. Já Reis et al. (2003) observaram maior potencial de ligação em sêmen resfriado de suínos quando se aumentou a concentração de espermatozoides incubados, com resultados médios superiores ao do presente estudo, sendo 2,57% de ligação utilizando 6,25 milhões de espermatozoides/mL e 2,74% de ligação utilizando 12,5 milhões de



espermatozoides/mL.

Amann et al. (1999) observaram médias mais elevadas, com 5,2% de ligação em sêmen *in natura* de suínos utilizando 5 milhões de espermatozoides durante a incubação, e constataram ainda que, em humanos, o percentual de espermatozoides ligados foi dose-dependente decrescente. Tal fato sugere que à medida que aumentava a concentração havia também aumento na competição, o que reduz a probabilidade de ligação, independente do potencial de ligação da célula espermática. Segundo Barbato et al. (1998), o maior percentual de espermatozoides ligados quando se utiliza sêmen *in natura* em relação ao presente estudo, em que se utilizou sêmen congelado, deve-se aos danos celulares causados pelo processo de congelamento e descongelamento das partidas.

Segundo esses autores, a variação do valor de ligação de espermatozoides em suínos parece ser maior do que nas outras espécies, embora ainda não seja conhecida a razão para tal. Já em outras espécies como perus (Gill et al., 1999), galos (Barbato et al., 1998) e humanos (Amann et al., 1999), o percentual de espermatozoides ligados tende a decrescer progressivamente com o aumento do número de espermatozoides (acima de 2 milhões de espermatozoides/mL), uma vez que ocorre redução da probabilidade de ligação, devido ao aumento da competição entre células (Amann et al., 1999; Gill et al., 1999).

### Experimento 2

A motilidade progressiva e o vigor espermático do sêmen foram de  $39,4 \pm 1,2$  e  $3,0 \pm 0,5$ , respectivamente, sem diferença entre animais e amostras ( $P > 0,05$ ). O número médio de espermatozoides ligados/mm<sup>2</sup> foi de  $339,3 \pm 255,5$  e  $275,4 \pm 164,0$  e a porcentagem de espermatozoides ligados, de  $0,34 \pm 0,25$  e  $0,27 \pm 0,16$ , respectivamente, para os meios BTS e B-TALP ( $P > 0,05$ ).

Também não houve diferença no teste de ligação entre animais e amostras pós-descongelamento ( $P > 0,05$ ), indicando que não houve variação entre o sêmen congelado dos animais, por isso registra-se a mesma capacidade fecundante.

Já Amann et al. (1999) observaram variação de 3 a 35% de espermatozoides de homens ligados à membrana da gema do ovo e atribuíram tal variação às diferenças na capacidade de fertilização entre os indivíduos, sendo possível que não tenha havido diferença nas médias dos resultados desse estudo por dois motivos: o processo de congelamento utilizado não afetou as estruturas de superfície dos espermatozoides responsáveis pela sua adesão à membrana; ou os indivíduos utilizados não apresentaram diferenças entre qualquer outra variável analisada, estando eles, possivelmente, com as mesmas condições de fertilização.

De acordo com Corcini (2012), existe a possibilidade de adequação dos testes de ligação espermática para realização de procedimentos de ranqueamento de machos em condições de central de coleta de sêmen.

As variáveis estudadas não apresentaram correlação significativa em nenhum dos experimentos realizados, enquanto Barbato et al. (1998) registraram correlações do teste de ligação com algumas características seminais, como o volume seminal (0,34), a concentração espermática (0,54) e a taxa de fertilidade (0,83), o que leva a concluir que os testes *in vitro* de avaliação do potencial de ligação dos espermatozoides podem ser úteis para prever casos de subfertilidade nos machos.

Estes mesmos autores afirmaram ainda que a gama relativamente elevada entre resultados de fertilidade nos casos de animais com elevado potencial de ligação pode ocorrer pelo fato de que o máximo potencial de fertilização requer outros atributos além de motilidade e ligação. No entanto, populações de espermatozoides com baixo potencial de ligação provavelmente possuem menor número de espermatozoides ligados, independentemente dos outros atributos dessas células. Assim, esse teste seria mais efetivo para prever subfertilidade, ao invés de fertilidade.

Portanto, sabendo-se que os resultados de testes *in vitro* de ligação de espermatozoides aos oócitos podem ser afetados por um grande número de variáveis, a utilização da membrana perivitelina da gema do ovo se torna uma alternativa viável para estudar a capacidade fecundante de espermatozoides suínos por eliminar o fator variabilidade natural entre oócitos, visto que a membrana de uma única gema pode ser fragmentada e utilizada para ser incubada com diferentes amostras, sendo avaliado, assim, mais de um indivíduo ou tratamento, como foi o caso do presente estudo.

### Conclusões

A concentração espermática, assim como os meios de incubação utilizados, não interferiu na capacidade de adesão de espermatozoides à membrana perivitelina interna da gema do ovo em animais da raça Piau.

### Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro.



### Referências

- Amann RP, Hammerstedt RH, Shabanowitz RB.** Exposure of human, boar, or bull sperm to a synthetic peptide increases to binding to an egg-membrane substrate. *J Androl*, v.20, p.34-41, 1999.
- Barbato GF, Cramer PG, Hammerstedt RH.** A practical in vitro sperm-egg binding assay that detects subfertiles males. *Biol Reprod*, v.58, p.686-699, 1998.
- Bernardi ML.** Tecnologias aplicadas no exame do ejaculado suíno para a produção de doses de sêmen de alta qualidade. *Acta Sci Vet*, v.36, p.5-16, 2008.
- Corcini CD.** Estudo de testes *in vitro* para predição de fertilidade de machos mamíferos. 2010. 94f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, 2010.
- Corcini CD, Silva BE, Brizolara RMR, Gheller SMM, Varela Junior AS, Bongalhardo DC, Lucia T Jr.** Concentração de lactato de cálcio e tempo de incubação sobre a capacidade de adesão e penetração de espermatozoides suínos na membrana perivitelina do ovo da galinha. *Ciênc Rural*, v.42, p.142-146, 2012.
- Gadea J.** Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. *Theriogenology*, v.24, p.431-444, 2005.
- Gill SPS, Donoghue AM, Holsberger DR, Amann RP, Hulet RM.** Identifying potentially subfertile toms via a sperm-binding assay. *Poult Sci*, v.78, p.1208-1218, 1999.
- Macedo MC Jr, Deschamps JC, Lucia T Jr, Bordignon J, Serret CG, Rambo G, Pivato I, Schmitt E.** In vitro penetration of fresh and vitrified swine oocytes by homologous spermatozoa using different incubation systems. *Anim Reprod Sci*, v.92, p.334-348, 2006.
- Macedo MC Jr, Lucia T Jr, Rambo G, Ferreira Filho Eb, Rosa AP, Fabiane C, Cabral M, Deschamps JC.** In vitro penetration of swine oocytes by homologous spermatozoa: Distinct systems for gamete's co-incubation and oocyte's cryopreservation. *Anim Reprod Sci*, v.117, p.295-301, 2010.
- Mugnier S, Aquila MED, Pealez J, Douet C, Ambruosi B, Santis TD, Lacalandra GM, Lebos C, Sizaret PY, Delaleu B, Monget P, Mermillod P, Meyers SA, Goudet G.** New insights into the mechanisms of fertilization: comparison of the fertilization steps, the composition, and the structure of the zona pellucida between horses and pigs. *Biol Reprod*, v.81, p.856-870, 2009.
- Peña A, Linde-Forsberg C.** Effects of equine one or two step dilution and two freezing thawing rates on post thaw survival of dog spermatozoa. *Theriogenology*, v.54, p.859-875, 2000.
- Reis GR, Bernardi ML, Wentz I, Bortolozzo FP, Weitze KF, Amann R, Kellers C, Zemmrich J.** Fertilidade de sêmen suíno avaliada pelo teste de ligação dos espermatozoides a um substrato sintético. *Pesq Agropec Bras*, v.38, p.1343-1349, 2003.
- Robertson L, Brown HL, Staines HJ, Wishart GJ.** Characterization and application of an avian in vitro spermatozoa-egg interaction assay using the inner perivitelline layer from laid chicken eggs. *J Reprod Fertil*, v.110, p.205-211, 1997.
- Robertson L, Wishart GJ.** In vitro sperm-egg interaction assay utilizing inner perivitelline layer from laid chicken eggs. In: Bakst MR, Cecil HC. (Ed.). *Techniques for semen evaluation, semen storage, and fertility determination*. Savoy, IL: Poultry Science Association, 1997. p.64-67.
- Schreiner JLC.** As raças nacionais de suínos. *Suincult Ind*, v.100, p.34-36, 1987.
- Sollero BP, Paiva SR, Faria DA, Guimarães SEF, Castro STR, Egito AA, Albuquerque MSM, Piovezan U, Bertani GR, Mariante AS.** Genetic diversity of Brazilian pig breeds evidenced by microsatellite markers. *Livest Sci*, v.123, p.8-15, 2009.
-