

AVALIAÇÃO DA MOTILIDADE, FUNCIONALIDADE MITOCONDRIAL E TESTE DE PENETRAÇÃO *IN VITRO* DE ESPERMATOZOIDES SUÍNOS

TAIRAN OURIQUE MOTTA^{1,2}; GUILHERME RIZZOTO²; ANDERSON AMAURI DA COSTA GUARISE²; CARLOS EDUARDO RANQUETAT FERREIRA²; FABIANA MOREIRA²; THOMAZ LUCIA JR^{2,3}

¹Universidade Federal de Pelotas – tairanourique@gmail.com

²ReproPel – Faculdade de Veterinária - Universidade Federal de Pelotas

³Universidade Federal de Pelotas – tluciajr@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A qualidade dos ejaculados dos machos usados como doadores de sêmen em centrais de IA possuem grande impacto no melhoramento genético e na eficiência reprodutiva dos plantéis (WABERSKI et al., 2008). A utilização de inseminação artificial (IA) em suínos com sêmen resfriado tem representado um crescente aumento (BORTOLOZZO et al., 2005). No Brasil, estima-se que 1,6 milhões de IA sejam realizadas, abrangendo em torno de 50% do plantel de matrizes em sistemas tecnificados. Dessa forma, a qualidade seminal referente aos resultados das avaliações convencionais pode ser influenciada pelas características individuais dos machos doadores de sêmen (POPWELL; FLOWERS, 2004; MACEDO et al., 2010), principalmente quando utilizado em doses homospermicas.

As avaliações convencionais (motilidade, vigor e morfologia espermática) comumente utilizadas em granjas comerciais, apresentam limitada capacidade de identificar diferenças de menor magnitude, entre machos com potencial de fertilidade mais homogênea (GADEA, 2005). Portanto, sua associação com a fertilidade *in vivo* é limitada, em especial porque estes testes *in vitro* não conseguem reproduzir todos os eventos fisiológicos envolvidos no processo de fertilização (TSAKMAKIIDIS et al., 2010). Testes que avaliam a penetração espermática *in vitro* tem sido utilizados em detrimento de testes convencionais de avaliação seminal, por fornecerem informações sobre algumas etapas destes processos (MACEDO et al., 2006). Este estudo tem como objetivo avaliar e comparar as características seminais (motilidade, funcionalidade mitocondrial e penetração oocitária *in vitro*) de diferentes machos suínos.

2. METODOLOGIA

Foram utilizados quatro reprodutores suínos, mantidos em regime de coleta semanal, em uma Central de Inseminação Artificial de uma agroindústria localizada no centro oeste de Santa Catarina. A coleta dos animais foi realizada pelo método de mão enluvada (BORTOLOZZO et al., 2005) sendo realizadas dez coletas por macho.

As avaliações de motilidade espermática, funcionalidade mitocondrial e penetração oocitária *in vitro* foram realizadas no laboratório de Reprodução Animal (ReproPEL) da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas.

A motilidade foi analisada seguindo os parâmetros de qualidade seminal, segundo recomendações do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA,

2013). A funcionalidade mitocondrial (MIT), foi realizada segundo as descrições de EVENSON et al., (1982). Neste teste, sua intensidade da fluorescência indica o número de mitocôndrias íntegras presentes em cada célula espermática, marcadas pela Rodamina 123. Os espermatozoides que apresentaram fluorescência verde foram classificados como funcionais e os que não apresentaram fluorescência foram classificados como não funcionais.

Também foi avaliado o potencial fertilizante *in vitro*, pelo teste de penetração *in vitro* (PIV), que consiste na capacidade do espermatozoide reconhecer e ligar-se aos receptores presentes na zona pelúcida de oócitos suínos. Foram utilizados 30 oócitos suínos por ejaculado conforme descrito por CORCINI (2010). Os gametas foram incubados em banho-maria por 6 h, a 39°C. Após esse período, os oócitos foram recuperados, lavados, submetidos ao corante Hoescht 33342 e avaliados em microscópio de epifluorescência (400 X). As respostas avaliadas foram a taxa de penetração nos oócitos e o número de espermatozoides por oócito penetrado.

Para a análise estatística os dados foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis para dados não-paramétricos realizados no software Statistix® (2008).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A motilidade observada para os machos variou entre 85% (macho A) a 86% (macho C) (Tabela 1), sem diferença entre os reprodutores ($P > 0,05$). A funcionalidade mitocondrial também foi semelhante entre os machos ($P > 0,05$). Este fato pode estar associado com o estudo de RODRIGUES-MARTINEZ (2005), o qual descreveu que a integridade e funcionalidade das mitocôndrias espermáticas, possuem correlação positiva com a motilidade. BROEKHUIJSE et al., (2012a) verificaram que a motilidade espermática corresponde a 9 e 10 % do efeito direto do macho sobre a taxa de parição e o número total de leitões nascidos, respectivamente. Por outro lado, uma variação na motilidade entre 60 e 90% não altera estas mesmas respostas (BROEKHUIJSE et al., 2012b). Portanto, a motilidade espermática, isoladamente, não é um parâmetro preciso para a seleção de um reprodutor.

A taxa de penetração oocitária *in vitro*, para o macho B foi superior à observada para o macho C ($P < 0,05$) (Tabela 1). Porém., o macho C apresentou o maior número de espermatozoides por oócito. Normalmente, a fecundação não ocorre com o primeiro espermatozoide a alcançar o oócito, e sim após certa quantidade de espermatozoides estar aderidos a zona pelúcida. Assim, pode-se sugerir que os espermatozóides do macho C apresentaram melhor preparação do oócito para a fecundação. O teste de penetração *in vitro* fora mais eficaz na predição de fertilidade suína, porém requer maior desenvolvimento para alcançar uma boa relação custo:benefício na sua utilização (RUIZ-SANCHEZ et al, 2006). POPWELL ; FLOWERS (2004) observaram que dois machos apresentavam correlação entre a penetração *in vitro* e à taxa de parição, porém esta correlação não foi observada para um terceiro macho. Dessa forma, a capacidade de identificar diferenças na fertilidade relativa entre machos férteis ainda é limitada. Portanto, ainda são necessários estudos que caracterizem associações precisas entre métodos de avaliação de qualidade seminal *in vitro* com o desempenho reprodutivo *in vivo* são relevantes, permitindo a detecção de machos sub-férteis e, também, diferenciando de forma mais precisa indivíduos com níveis distintos de fertilidade (WABERSKI et al., 2008).

Tabela 1: Parâmetros de qualidade seminal *in vitro* (média erro \pm padrão da média) para quatro machos suínos (n=10 ejaculados por animal).

Parâmetros	Machos			
	A	B	C	D
Motilidade (%)	85,0	85,5	86,0	85,5
Função mitocondrial (%)	82.9 \pm 7,1	83.3 \pm 9.8	85.3 \pm 8.3	79.0 \pm 22.5
Penetração <i>in vitro</i> (%)	40.1 \pm 10.7 ^{ab}	56.4 \pm 24.1 ^a	29.2 \pm 11.7 ^b	42.5 \pm 14 ^{ab}
EspERMatozóides/Oócito	2. 1 \pm 1.7 ^b	3.3 \pm 1.5 ^{ab}	4.7 \pm 1.4 ^a	2.0 \pm 0.3 ^b

*Letras diferentes representam diferença significativa (P<0,05) nas linhas.

4. CONCLUSÕES

A motilidade espermática e a funcionalidade mitocondrial não diferiram entre os quatro machos avaliados, mas a taxa de penetração oocitaria *in vitro* para o macho B foi superior à observada par o macho C.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I. Situação da IA em suínos no Brasil e no mundo. In: inseminação artificial na suinocultura tecnificada. BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I; BENNEMANN, P.E. et al.(Ed.), Ed. Pallotti, Porto Alegre- RS, 2005, v.2, p. 15-21.

BROEKHUIJSE, M.L.W.J.; SOSTARIC, E.; FEITSMA, H.; GADELLA, B.M. The value of microscopic semen motility assessment at collection for a commercial artificial insemination center, a retrospective study on factors explaining variation in pig fertility. *Theriogenology*. 2012, v. 77, p. 1466-1479a.

BROEKHUIJSE, M.L.W.J.; SOSTARIC, E.; FEITSMA, H.; GADELLA, B.M. 2011. Additional value of computer assisted semen analysis (CASA) compared to conventional motility assessments in pig artificial insemination. *Theriogenology*. 2011, v.76, p. 1473-1486b.

CBRA. Manual para exame andrológico e avaliações de Sêmen animal. COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, CBRA, Belo Horizonte-MG, 2013, 3^oed, p.104.

CORCINI, C.D. Estudo de testes *in vitro* para predição de fertilidade de machos mamíferos 2010. 94f. Tese (Doutorado em Biotecnologia), Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

EVENSON, D.P.; DARZYNKIEWICZ, Z.; MELAMED, M.R. Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1982, V. 30, p. 279-280.

GADEA J. Sperm factors related to *in vitro* and *in vivo* porcine fertility. *Theriogenology*, 2005, v. 63, p. 43-444.

MACEDO, M.C.; DESCHAMPS, J.C.; T. Jr. Et al. *In vitro* penetration of fresh and vitrified swine oocytes by homologous spermatozoa using different incubation systems. *Animal Reproduction Science*, 2006, v. 92, p. 334-348.

MACEDO, M.C. Jr.; LUCIA, T. Jr.; RAMBO, G et al. *In vitro* penetration of swine oocytes homologous spermatozoa: distinct systems for gamete's co- incubation and oocyte's cryopreservation. *Animal Reproduction Science*, 2010, v. 117, p. 295-301.

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*, 2004, v. 81, p. 97-113.

RUIZ-SANCHEZ, A.L.; O'DONOGHUE, R.; NOVAK, S. et al. The predictive value of routine semen evaluation and IVF technology for determining relative boar fertility. *Theriogenology*, 2006, v. 66, p. 736- 748.

STATISTIX[®], Statistix 9 Analytical Software. Tallahassee, FL, USA. 2008.

TSAKMAKIDIS, I.A.; LYMBEROPOULOS, A.G.; KHALIFA, T.A.A. Relationship between sperm quality traits and field- fertility of porcine semen. *Journal of Veterinary Science*, 2010, v. 11, p. 151-154.

WABERSKI, D.; PETRUNKINA, A.M.; TÖPFER- PETERSEN E. Can external quality control improve pig AI efficiency? *Theriogenology*, 2008, v. 70, p. 1346-1351.

WABERSKI, D.; SCHAMANNA, E.; HENNINGA, h. et al. Sperm chromatin structural integrity in normospermic boars is not related to semen storage and fertility after routine AI. *Theriogenology*, 2011, v. 75, p. 337- 345.