

TESTE DE ADESÃO ESPERMÁTICA HETERÓLOGO *IN VITRO* MODIFICADO

DIAS, Lúcia Pereira ¹;
GHELLER, Stela Mari Meneghello ¹;
VARELA JUNIOR, Antônio Sérgio ²;
SILVA, Estela Fernandes ³;
SILVA, Betris Elert da ¹;
MARTINEZ, Pablo Elias ²;
LUCIA, Thomaz Jr. ¹;
CORCINI, Carine Dahl ¹.

Recebido: 13/10/2015

Aceito: 07/03/2016

¹Laboratório de Reprodução Animal, Faculdade de Veterinária, UFPEL; ²Instituto de Ciências Biológicas, FURG;
³Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, FURG.

RESUMO

O teste de adesão espermática heterólogo (espécies diferentes doadoras de gameta masculino e feminino) *in vitro*, apesar de ser sensível para determinação da fertilidade, conta com meios e sistemas de incubação onerosos. Assim, o objetivo deste trabalho foi simplificar o teste de adesão espermática heterólogo *in vitro*, avaliando a viabilidade de utilização do Meio M2 em banho maria a 39 °C frente ao meio KRB em estufa de CO₂ a 5% (método original). Os ovócitos foram obtidos de leitoas pré-púberes, com diâmetro folicular entre 3-6 mm, selecionados e desnudados por sucessivas pipetagens. Os espermatozoides foram obtidos através do corte da cauda epididimária de ratos *Wistar* adultos. A concentração final no meio de fertilização foi de 1x10⁶ espermatozoides/mL. Em cada tratamento foram utilizados *pools* de 30 ovócitos para cada macho. O grupo controle foi incubado em meio de Krebs-Ringer bicarbonato (KRB) e em incubadora de CO₂ a 5%, e no grupo tratado (T1) o meio foi M2 (Sigma, M7167) com HEPES e albumina sérica bovina (BSA) e incubado em banho-maria a 39 °C. A co-incubação (espermatozoides/ovócito) foi realizada por 2 h a 37 °C. A adesão foi avaliada por exposição dos ovócitos a uma solução de Hoescht 33342 em PBS e incubados a 37 °C/15 min, seguido de avaliação em microscópio de epifluorescência em aumento de 400X. A taxa de adesão de espermatozoides no ovócito, no grupo controle e T1, não diferiram estatisticamente, foram de 23,5±3,9% e 24,7±4,2%, respectivamente. Também não foi observada diferença significativa entre os tratamentos para o número de espermatozoides/ovócito (Controle = 0,9±0,1 e T1 = 0,8±0,1) (p>0,05). Estes resultados demonstraram que o método simplificado (T1) não interfere nos resultados do teste de adesão espermática. Desse modo, o teste de adesão espermática pode ser simplificado com a utilização do banho-maria, sem que ocorram alterações nas taxas de adesão e polispermia.

Palavras-chave: Ovócito. Fertilização. Sêmen.

INTRODUÇÃO

Os ratos são modelos biológicos consolidados e difundidos mundialmente, úteis para os mais variados tipos de pesquisas, devido ao vasto conhecimento da anatomia e fisiologia destes animais, além da semelhança morfofisiológica com a espécie humana (GRAHAM; NADEAU, 2014; PAGLIARANI et al., 2014; RAUNIG et al., 2011). Em pesquisas na área da reprodução os ratos são fundamentais nos estudos de biologia reprodutiva, para maior compreensão de temas como patologias placentárias, infertilidade, entre outros (RAUNIG et al., 2011; YU et al., 2014). Entretanto, é crescente a preocupação acerca da utilização de animais em pesquisas, principalmente após a criação dos princípios dos 3 R's de Russel e Burch (1992) que tratam da redução do número de animais, refinamento dos métodos para evitar sofrimento e finalmente a substituição dos animais em pesquisas. Os ensaios reprodutivos que necessitam da eutanásia de inúmeras fêmeas para obtenção de ovócitos e embriões, podem ser conflitantes com tais princípios (ORYAN ABKENAR et al., 2014; SHIBAO et al., 2014).

A fim de diminuir a utilização de fêmeas de ratos em estudos de biologia reprodutiva foi criado o teste de adesão *in vitro* (TAIV) com gametas heterólogos, ou seja, utilizando espermatozoides de ratos e ovócitos de fêmeas suínas, contribuindo para estudos de infertilidade, toxicologia reprodutiva, patologias espermáticas, dentre outros. O TAIV é capaz de determinar o potencial de fertilização de reprodutores através da capacidade de adesão espermática à zona pelúcida (ZP) do ovócito, simulando eventos ocorridos durante a fertilização *in vivo* (LARSSON; RODRIGUES-MARTINEZ, 2000; POPWELL; FLOWRES, 2004), possuindo maior capacidade de identificar alterações espermáticas frente a testes clássicos como os de motilidade, morfologia, choque hipo osmótico, teste de termo resistência (MACEDO et al., 2006) e o teste de avaliação da reação acrossomal (FAZELI et al., 1997).

Embora existam diversos estudos demonstrando a eficácia do teste de adesão espermática *in vitro* (GADEA et al., 1998; MACEDO et al., 2006), ele é pouco utilizado, em grande parte devido ao custo dos equipamentos, como a estufa, de atmosfera controlada com CO₂, e dos insumos, como os meios de incubação dos gametas.

Tendo em vista a sensibilidade do TAIV frente às avaliações seminais clássicas e a possibilidade de substituição de fêmeas murinas por ovários suínos obtidos de abatedouro, seria de interesse a simplificação do TAIV para torná-lo um teste de rotina em estudos reprodutivos. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a viabilidade de utilização do meio M2 em banho Maria (método simplificado) frente ao meio KRB em estufa de CO₂ a 5% (controle, método original).

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 10 machos de ratos *Wistar* provenientes do biotério da FURG (Comitê de ética P006/2011). Os procedimentos utilizados para a experimentação e eutanásia seguiram as recomendações da Lei Federal n. 6.638 de 8 de maio de 1979. Os doadores de sêmen tinham idade de 4 meses, e a coleta do trato reprodutivo foi realizada por laparotomia com exposição e remoção do mesmo. Em seguida, foi coletado o epidídimo de ambos os lados e lacerados com agulha hipodérmica (12gx40mm) e colocados em placa de poços contendo 2 ml em meio de manutenção, tampão fosfato salino (PBS, phosphate buffered saline).

A avaliação da qualidade espermática foi realizada após incubação das amostras por 10 minutos a 37 °C em meio de manutenção PBS. A motilidade espermática foi determinada pelo percentual de células vivas em movimento progressivo identificadas no campo do microscópio, em aumento de 200X (SZTEIN et al., 2000) com escala de motilidade 0–100%.

A morfologia espermática foi determinada como descrito por Tayama et al. (2006), por meio de células fixadas em solução de formol salina, com contagem de 200 células em microscopia de contraste de fase com aumento de 200X. Para determinação da concentração espermática utilizada no teste de TAIV, se utilizou câmara de Neubauer.

A avaliação da integridade do DNA, foi através da sonda Acridine Orange (A6014, Sigma) com protocolo adaptado de Evenson et al. (1999). Em uma alíquota de 20 µL de sêmen, colocou-se 10 µL de TNE (0,01 M Tris-HCl, 0,15 M NaCl, 0,001 M EDTA; pH 7,2), após 30 segundos adicionou-se 100 µL de Triton 1X e passado 30 segundos, adicionou-se 50 µL de Acridine Orange (2 mg/mL em H₂O deionizada). Foram consideradas células com DNA normal (bicatenário) aquelas que apresentaram fluorescência verde, e aquelas com coloração vermelha ou amarelada foram consideradas com DNA desnaturado

(monocatenário). As avaliações foram executadas em microscópio de epi-fluorescência (Olympus BX 51, América INC, São Paulo-Brasil) sob aumento de 400X.

Para esta avaliação, os ovócitos foram obtidos pela punção de folículos ovarianos de leitoas pré-púberes, abatidas em frigorífico local, sendo armazenados em recipiente térmico com solução salina a 0,9% a 39 °C contendo gentamicina (40mg/ml) até a chegada ao laboratório, dentro de 60 min. No laboratório a punção folicular foi realizada com auxílio de vácuo (aspira Max) aguardando-se 15 min. para que houvesse a sedimentação, após sendo feita busca em lupa estéreo-microscópica em placa de Petri contendo PBS 1X. O processamento dos ovócitos foi realizado como descrito por Macedo et al. (2006; 2010). No teste de adesão *in vitro* utilizou-se em cada tratamento para cada macho *pools* de 30 ovócitos, conforme Maleszewski et al. (1995).

Os tratamentos foram os seguintes, tratamento Controle: meio KRB (94,6 mM de NaCl; 4,78 mM de KCl; 1,71 mM CaCl₂; 1,19 mM KH₂PO₄; 1,19 mM MgSO₄; 25,07 mM NaHCO₃; 21,58 mM Lactato de sódio; 0,5 mM Piruvato de sódio; 5,56 mM glucose; 4,0 mg/mL BSA; 50 µg/mL Estreptomicina; 75 µg/mL Penicilina) (JIANG; TSANG, 2004) em estufa de CO₂ a 5%, e o tratamento 1 (T1): meio M2 com HEPES e BSA (M7167-Sigma) em banho maria a 37 °C (CORCINI et al., 2012). Ambos incubados por duas horas com concentração final de 1,6x10⁶ células/ml.

Após a co-incubação, os ovócitos foram recuperados, lavados, corados com Hoechst 33342 (10 mg/mL), e avaliados a 400X em microscópio de epi-fluorescência (Olympus BX 51, América INC, São Paulo, SP). Os ovócitos foram considerados aderidos quando sua ZP continha pelo menos um espermatozoide no espaço perivitelíneo ou citoplasma (MACEDO et al., 2006; 2010). Para cada macho, o número de ovócitos aderidos e de espermatozoides por ovócitos foram contados, e a taxa de adesão *in vitro* calculada.

Todos os produtos químicos utilizados neste trabalho eram da Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, EUA).

As variáveis da taxa de adesão e o número de espermatozoides por ovócito foram analisados pelo método chi-quadrado. Todas as análises estatísticas foram conduzidas através do software Statistix 8.0® (2003).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os ejaculados utilizados apresentaram motilidade espermática média de $58,9 \pm 30\%$, a integridade do DNA de $93,6 \pm 5,6\%$, e na avaliação de morfologia espermática $90,2 \pm 17,8\%$ de células consideradas normais. Motilidade e morfologia são variáveis determinantes para capacidade fertilizante, assim as médias de qualidade seminal comprovam que os animais estavam aptos à participação nos testes de adesão uma vez que apresentavam mais de 50% de células normais (morfologia) e móveis (motilidade) (JIANG; TSANG, 2004).

Conforme os resultados da Tabela 1, verifica-se que não houve diferença estatística entre Controle e T1. Este resultado indica que é possível realizar o teste de adesão através de T1 (método simplificado), provando a viabilidade de utilização de um método simplificado para realização do teste de adesão com ratos. Esse resultado pode contribuir fundamentalmente em estudos de biologia reprodutiva devido a sua sensibilidade, e a utilização de teste com ovócitos de suínos vai dispensar a utilização de fêmeas murinas que necessitariam passar por um processo de indução hormonal e também de eutanásia para coleta do material, desta forma utilizando o princípio do 3 R's.

Tabela 1 - Taxa de adesão e número de espermatozoides por ovócito nos diferentes métodos e meios de incubação com sêmen de rato e ovócitos de suínos (10 machos X 30 ovócitos por tratamento). Não houve diferença estatística ($p > 0,05$).

Meios de Incubação	Taxa de adesão (%)	Número de espermatozoide/Ovócito
MKBR em estufa de CO ₂	$23,5 \pm 3,9$	$0,9 \pm 0,1$
M2 em banho-maria	$24,7 \pm 4,2$	$0,8 \pm 0,1$

Uma vez que a fecundação é um processo complexo que envolve uma série de eventos fisiológicos e bioquímicos, e vários atributos espermáticos são necessários para seu sucesso, cada vez mais, busca-se em testes laboratoriais uma simulação com o que ocorre *in vivo*, como o TAIV, mimetizam eventos como o aumento da motilidade (hiperativação), capacitação, reação acrossômica, adesão na ZP, ligação à membrana plasmática do ovócito, penetração no ooplasma e formação do pró-núcleo masculino. Devido a inúmeros fatores que podem comprometer a técnica de fertilização, com a utilização de um *pool* de ovócitos

de diferentes fêmeas diminui o efeito da qualidade ovocitária para o teste, possibilitando sim a diferenciação dos machos quanto à penetração.

Apesar da grande sensibilidade do TAIV, este teste apresenta alguns fatores limitantes para sua execução e um deles é o sistema de co-incubação: ovócito-espermatozoide. Atualmente, se utiliza a estufa de CO₂ como sistema de incubação, no entanto esse equipamento tem um custo elevado, pois o meio necessita de tempo de estabilização, além de exigir um local apropriado para execução (JIANG; TSANG, 2004).

Um resultado semelhante foi demonstrado por Macedo et al. (2006) que adaptaram técnicas de incubação submarina desenvolvida por Vajta et al. (1997) para a produção *in vitro* de embriões e, compararam três métodos de incubação: frasco, bag e estufa e verificaram que é possível utilizar modelos de incubação alternativos, em substituição a estufa de CO₂ para execução de testes de adesão espermática sem afetar as taxas de adesão, resultado que corrobora com aqueles encontrados neste trabalho, uma vez que não foi encontrada diferença significativa entre Controle e T1 (método alternativo).

CONCLUSÃO

O teste de adesão espermática heterólogo *in vitro* modificado pode ser utilizado como rotina em experimentos de capacidade fertilizante de espermatozoides murinos.

MODIFIED *IN VITRO* HETEROLOGOUS SPERM ADHESION TEST

ABSTRACT

The *in vitro* heterologous sperm adhesion test (different species of male and female gamete donor), although it is sensitive for the determination of fertility, and comprises costly means and incubation systems. The objective of this work was to simplify the heterologous sperm adhesion test *in vitro*, evaluating the feasibility of using M2 medium in a water bath at 39 °C against the KRB medium in a 5% CO₂ incubator (original method). The oocytes with follicular diameter of 3-6 mm were obtained from prepubertal gilts. They were selected and denuded by repeated pipetting. The sperm was obtained by cutting the epididymal tail of adult *Wistar* rats. The final concentration in the medium of fertilizing spermatozoa was 1x10⁶/mL. In each treatment pools of 30 oocytes for each male were used. The control group was incubated in Krebs-Ringer bicarbonate medium (KRB) in a 5% CO₂

incubator and in the treated group (T1), the medium was M2 (Sigma, M7167) with HEPES and bovine serum albumin (BSA) incubated in a water bath at 39 °C. The co-incubation (sperm/oocyte) was performed for 2 h at 37 °C. The adhesion was evaluated by exposing the oocytes to a Hoescht 33342 solution in PBS and incubated at 37 °C/15 min, followed by evaluation under an epi-fluorescence microscope at the 400X magnification. The sperm oocyte adhesion rate in the control group and T1 did not differ statistically, they were 23.5±3.9% and 24.7±4.2%, respectively. There was also no significant difference between treatments for the number of sperm/oocyte (control = 0.9±0.1 and T1 = 0.8±0.1) ($p > 0.05$). These results demonstrated that the simplified method (T1) did not affect the results of the sperm adhesion test. Thus, the sperm adhesion test can be simplified using the water bath without occurring changes in the adherence and polyspermy.

Keywords: Sperm. Oocyte. Fertilization.

PRUEBA DE ADHESIÓN ESPERMÁTICA HETERÓLOGA *IN VITRO* MODIFICADO

RESUMEN

El ensayo de adhesión espermática heterólogo (diferentes especies donadoras de gametos masculino y femenino) *in vitro*, a pesar de ser sensible para la determinación de la fertilidad, comprende medios y sistemas de incubación costosos. El objetivo de este trabajo fue simplificar el ensayo de adhesión espermática heterólogo *in vitro*, evaluando la viabilidad del uso del medio M2 en un baño maría a 39 °C frente al medio KRB en estufa de CO₂ al 5% (método original). Los ovocitos se obtuvieron de las lechonas prepúberes con el diámetro folicular de 3-6 mm, seleccionados y despojados por pipeteo repetido. El esperma se obtuvo mediante el corte de la cola del epidídimo de ratas *Wistar* adultas. La concentración final de los espermatozoides en el medio de fertilización fue de 1x10⁶/mL. En cada tratamiento se utilizaron grupos de 30 ovocitos por cada macho. El grupo control se incubó en el medio de Krebs-Ringer bicarbonato (KRB), en una incubadora de CO₂ al 5% y el grupo tratado (T1) el medio fue M2 (Sigma, M7167) con HEPES y albúmina de suero bovino (BSA) y se incubaron en un baño maría a 39 °C. La coincubación (espermatozoides/ovocito) se realizó durante 2 horas a 37 °C. La adhesión se evaluó mediante la exposición de los ovocitos a una solución Hoescht 33342 en PBS y se incubó a 37 °C/15 min, seguido de evaluación para microscopio de epi-fluorescencia a una ampliación de 400X. La tasa de adhesión de los espermatozoides al ovocito en el grupo control y T1 no difirió estadísticamente, fueron 23,5±3,9% y el 24,7±4,2%, respectivamente. Tampoco hubo diferencia significativa entre los tratamientos para el número de espermatozoides/ovocito (control = 0,9±0,1 y T1 = 0,8±0,1) ($p > 0,05$). Estos resultados demostraron que el método simplificado (T1) no afectó a los resultados de la prueba de adhesión de esperma. Por lo tanto, el ensayo de adhesión de espermatozoides se puede simplificar usando el baño sin que se produzcan cambios en la adherencia y poliespermia.

Palabras clave: Esperma. Ovocitos. Fertilización.

REFERÊNCIAS

- CORCINI, C. D.; STEPHAN, M. H. L.; COLARES, E. P.; et al. In vitro assays for vesper mice (*Calomys laucha*) sperm using heterologous substrates from non rodent species. **Journal of Experimental Zoology part A**, v. 317, n. 2, p. 96–102, 2012.
- EVENSON, D. P.; JOST, L. K.; MARSHALL, D.; et al. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. **Human Reproduction Update.**, v. 14, n. 4, p. 1039-1049, 1999.
- FAZELI, A.; HAGE, W. J.; CHENG, F. P.; et al. Acrosome-intact boar spermatozoa initiate binding to the homologous zona pellucid in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 56, p. 430-438, 1997.
- GADEA, J.; MATAS, C.; LUCAS, X. Prediction of porcine semen fertility by homologous in vitro penetration (HIVP) assay. **Animal Reproduction Science**, v. 54, n. 2, p. 95-108, 1998.
- GRAHAM, M. T.; NADEAU, K. C. Lessons learned from mice and man: Mimicking human allergy through mouse models. **Clinical Immunology**, v. 155, n. 1, p. 1–16, 2014.
- JIANG, J. Y.; TSANG, B. K. Optimal conditions for successful in vitro fertilization and subsequent embryonic development in Sprague–Dawley rats. **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 6, p. 1974–1979, 2004.
- LARSSON, B.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 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. Jr.; 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.
- MACEDO, M. C. Jr.; LUCIA, T. Jr.; RAMBO, G.; et al. *In vitro* penetration of swine oocytes by homologous spermatozoa: distinct systems for gamete's coincubation and oocyte's cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v. 117, n. 3-4, p. 295-301, 2010.
- MALESZEWSKI, M.; KLINE, D.; YANAGIMACHI, R. Activation of hamster zone-free oocytes by homologous and heterologous spermatozoa. **Journal of Reproduction Fertility**, v. 105, p. 99-107, 1995.
- ORYAN ABKENAR, Z.; GANJI, R.; KHAJEHRAHIMI, A. E.; BAHADORI, M. H. Vitrification and Subsequent *In Vitro* Maturation of Mouse Preantral Follicles in Presence of Growth Factors. **Cell Journal (Yakhteh)**, v. 16, n. 3, p. 271-278, 2014.
- PAGLIARANI, S.; LUCCHIARI, S.; ULZI, G.; et al. Glycogen storage disease type III: A novel AgI knockout mouse model. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1842, n. 11, p. 2318–2328, 2014.

- POPWELL, J. M.; FLOWERS, W. L. Variability in relationships between semen quality and estimates of in vitro fertility in boars. **Animal Reproduction Science**, v. 81, n. 1-2, p. 97–113, 2004.
- RAUNIG, J. M.; YAMAUCHI, Y.; WARD, M. A.; COLLIER, A. C. Placental inflammation and oxidative stress in the mouse model of assisted reproduction. **Placenta**, v. 32, n. 11, p. 852-858, 2011.
- RUSSELL, W. M. S.; BURCH, K. L. The principles of humane experimental technique. London: UFAW; 1992. Disponível em: <<http://altweb.jhsph.edu>>
- SHIBAO, Y.; FUJIWARA, K.; KAWASAKI, Y.; et al. The effect of a novel cryoprotective agent, carboxylated e-poly-L-lysine, on the developmental ability of re-vitrified mouse embryos at the pronuclear stage. **Cryobiology**, v. 68, n. 2, p. 200–204, 2014.
- SZTEIN, J. M.; FARLEY, J. S.; MOBRAATEN, L. E. In vitro fertilization with cryopreserved inbred mouse sperm. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 1774-1780, 2000.
- TAYAMA, K; FUJITA, H; TAKAHASHI, H.; et al. Measuring mouse sperm parameters using a particle counter and sperm quality analyzer: A simple and inexpensive method. **Reproductive Toxicology**, v. 22, p. 99-101, 2006.
- VAJTA, G; BOOTH, P. J.; HOLM, P.; et al. Successful vitrification of early stage bovine in vitro produced embryos with the open pulled straw (OPS) method. **Cryo-Letters**, v. 18, p. 191–195, 1997.
- YU, Z-Z; CHEN, J.; SHOU, P-Q.; FENG, L. Effects of micronutrients on the reproduction of infertility rat model induced by adenine. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 7, n. 9, p. 2754-2762, 2014.

Autor para correspondência:

Carine Dahl Corcini.

Universidade Federal de Pelotas. Campus Universitário, Caixa Postal 354, Capão do Leão (RS). CEP 96010-900.

corcinicd@gmail.com