

Ensaio de ligação do espermatozoide à membrana perivitelínica do ovo de galinha e sua correlação com testes funcionais em Jararaca (*Bothrops moojeni*)

Evelyn C. Lemos; Marcel H. Blank; Gabriel A. Novaes; Ricardo J.G. Pereira*

Departamento de reprodução animal da faculdade de medicina veterinária e zootecnia, Universidade de São Paulo.

e-mail: ricpereira@usp.br

Objetivos

Padronizar o ensaio de ligação do espermatozoide à membrana perivitelínica (ELEMP) do ovo de galinha como um método funcional para avaliar o sêmen de *Bothrops moojeni*.

Métodos e Procedimentos

Amostras seminais de 10 Jararacas foram agrupadas em pools (n = 5) e diluídas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) a uma concentração final de 25 x10⁶ espermatozoides por ml. Em seguida, cada amostra foi dividida igualmente em duas alíquotas: uma mantida em geladeira (5 °C; vivo) e outra submetida ao congelamento rápido (NL₂) para induzir lesão e morte celular (morto). Posteriormente, cada alíquota foi igualmente misturadas nas proporções (0, 25, 50, 75 e 100%; relação de espermatozoides vivo/morto). A partir dessas proporções foram realizados o ELEMP, análise computadorizada da motilidade espermática e testes funcionais. Os dados foram analisados pelo SAS System for Windows. O efeito das proporções foi determinado utilizando um modelo paramétrico linear geral (PROC GLM). Correlação de Pearson foi utilizada para calcular a relação entre cada variável estudada com p <0.01.

Resultados

Os resultados são apresentados na tabela 1 e figura 1.

Tabela 1. Correlação entre o número de espermatozoides ligados por mm² (S/mm²) e motilidade (Mot), Motilidade progressiva (Pro), acrossoma íntegro (AI) e membrana íntegra (MI).

	S/mm ²	Mot (%)	Pro (%)	AI (%)	MI (%)
S/mm ²	1.000	0.81	0.78	0.84	0.84
		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

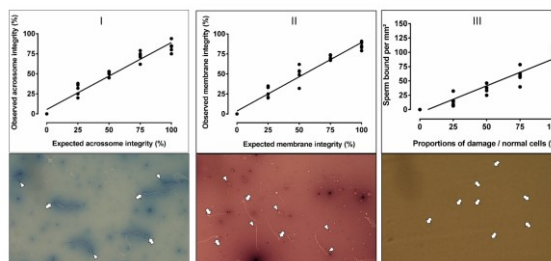


Figura 1: Validação das técnicas funcionais de integridade acrossomal (I) e da membrana plasmática (II) e do ELEMP (III). Setas indicam espermatozoides íntegros e triângulos indicam espermatozoide lesados.

Conclusões

Assim como descrito por Losano et al. (2015) em touro, nossos resultados indicam que o ELEMP pode ser um importante parâmetro para determinar a viabilidade e o potencial fecundante dos espermatozoides de *Bothrops moojeni*.

Referências Bibliográficas

Losano JDA, Angrimani DSR, Pereira RJG, Rocha AM, Criscuolo TS, Barnabe VH, Barnabe RC, Mendes CM, Assumpção MEOA, Nichi M. Utilisation of sperm-binding assay combined with computer-assisted sperm analysis to evaluate frozen-thawed bull semen. Andrologia. 47, 77-84, 2015.

Sperm-binding assay and its relation with functional tests in Brazilian Lancehead viper (*Bothrops moojeni*)

Evelyn C. Lemos; Marcel H. Blank; Gabriel A. Novaes; Ricardo J.G. Pereira*

Department of Animal Reproduction, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo

e-mail:ricpereira@usp.br

Objective

Standardized the sperm-binding assay in perivitelline membrane of hen's eggs as a functional method for evaluate *Bothrops moojeni* semen.

Methods and Procedures

Seminal samples from 10 *Bothrops moojeni* were pooled (n = 5) and diluted in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) to a final concentration of 25×10^6 sperm per ml. Each sample was then divided equally into two aliquots: one kept in a refrigerator (5 °C; live) and one subjected to rapid freezing (NL₂) to induce injury and cell death (dead). Subsequently, each aliquot was equally mixed in proportions (0, 25, 50, 75 e 100%; ratio of live/dead sperm). From these proportions, sperm-binding essay, computer-assisted sperm analysis (CASA) and functional tests were performed. All data were evaluated using SAS System for Windows. The effect of proportions was determined using parametric general linear model (PROC GLM). Pearson correlation was used to calculate the relationship between each variables studied with $p < 0.01$.

Results

Results are show in table 1 and figure 1.

Table 1. Relationship between the number of spermatozoa bound per mm² (S/mm²) and percentage of motility (Mot), progressive motility

(Pro), acrosome integrity (IA) and plasma membrane integrity (IM).

	S/mm ²	Mot	Pro	IA	IM
S/mm ²	1.000	0.81	0.78	0.84	0.84
		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

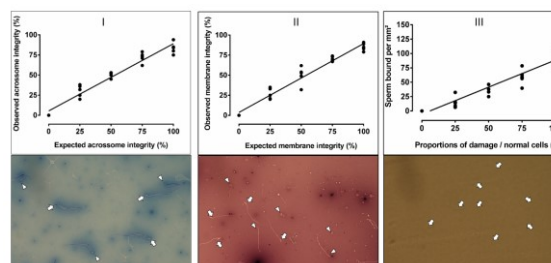


Figure 1. Functional techniques validation; (I) Acrosome integrity; (II) plasma membrane integrity and sperm binding assay (III). Arrows indicate intact sperm and triangles indicate injured sperm.

Conclusions

As described by Losano et al. (2015) in bull, our results indicate that sperm-binding assay may be an essential parameter to determine the viability and fecundating potential of the Brazilian Lancehead viper sperm.

References

Losano JDA, Angrimani DSR, Pereira RJG, Rocha AM, Criscuolo TS, Barnanbe VH, Barnabe RC, Mendes CM, Assumpção MEOA, Nichi M. Utilisation of sperm-binding assay combined with computer-assisted sperm analysis to evaluate frozen-thawed bull semen. Andrologia. 47, 77-84, 2015.