

TESTE DE LIGAÇÃO À ZONA PELÚCIDA - AVALIAÇÃO DE DOIS MÉTODOS PARA CONTAGEM DE ESPERMATOZÓIDES

Chiochetta, L.1; Dode, M. A. N.2(*)

1Bolsista Fundapam, Caixa Postal 154, 79002-970 Campo Grande, MS; 2Embrapa Gado de Corte.

A zona pelúcida é a maior barreira que o espermatozóide precisa ultrapassar para que possa penetrar e fecundar um oócito. Somente os espermatozóides capacitados e com membrana íntegra podem se ligar à zona, sofrer a reação do acrossoma e fecundar. Portanto, a avaliação da interação do espermatozóide com a zona pelúcida é considerado um teste funcional para avaliar a fertilidade de uma amostra de sêmen. O presente estudo teve por objetivo avaliar a ligação à zona utilizando dois métodos para contagem de espermatozóides: microscopia de contraste de fase (CF) e microscopia de epifluorescência (FL). Amostras de sêmen de três reprodutores foram testadas utilizando-se um total de 118 oócitos. O sêmen foi descongelado, avaliado quanto à motilidade e vigor, e centrifugado duas vezes (200g por 15 minutos) com 5 ml de PBS suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). O *pellet* resultante foi ressuspensionado com 250 a 500 μ l de meio TALP e a concentração foi determinada. Ovários foram coletados em frigorífico, logo após o abate dos animais e armazenados em PBS, por 24 horas, a 4°C. Após esse período todos os folículos de 3-5 mm de diâmetro, presentes na superfície dos ovários, foram aspirados. Os oócitos obtidos foram desnudados e colocados em PBS suplementado com 10% SFB e antibióticos. Para a realização do teste de ligação, cada oócito foi transferido para uma gota de 10 μ l de meio TALP contendo os espermatozóides na concentração de 1×10^6 /ml. Oócitos e espermatozóides foram co-incubados por 4 horas a 38,5°C e 5 % de CO₂. Após o período de incubação os oócitos foram retirados das gotas, lavados de 7 a 10 vezes em PBS, sendo que os espermatozóides levemente ligados à zona foram retirados com auxílio de uma pipeta com um diâmetro ligeiramente inferior ao dos oócitos. Foram, então, colocados por um minuto em solução de formol salina e distribuídos em dois grupos. Um grupo foi levado ao microscópio de contraste de fase, e o outro corado com iodeto de propídeo e avaliado em microscópio de epifluorescência. A contagem dos espermatozóides ligados à zona pelúcida foi feita até o limite máximo de 200 células, devido à dificuldade de contar um número maior de espermatozóides, sendo que nesse caso os oócitos foram considerados como tendo mais do que 200 células (>200). Os touros A, B e C apresentaram, após o descongelamento, motilidade e vigor de 40% e 2,0, 40% e 2,0 e 60% e 3,0, respectivamente. Para o touro A foram avaliados 20 oócitos no CF e 19 na FL apresentando média de espermatozóides ligados à zona de $13,0 \pm 5,5$ e $19,8 \pm 5,4$, respectivamente. O touro B apresentou média de espermatozóides ligados de $20,6 \pm 9,3$ (n= 19) no CF e $22,6 \pm 8,7$ (n=19) na FL. O touro C apresentou mais do que 200 espermatozóides ligados tanto no CF (n=20) como na FL (n=21). Os resultados mostram que a contagem de espermatozóides após o teste de ligação pode ser feita tanto em CF como em FL, sendo que o primeiro método é mais fácil, mais rápido e dispensa o uso de corantes.

temáticas **Reprodução**