



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

LÍVIA BATISTA CAMPOS

**INTERAÇÕES *IN VITRO* ENTRE ESPERMATOZOIDES DE CATETOS (*Pecari
tajacu* Linnaeus, 1758) E SUBSTRATOS HETERÓLOGOS**

Mossoró - RN

2015

LÍVIA BATISTA CAMPOS

INTERAÇÕES *IN VITRO* ENTRE ESPERMATOZOIDES DE CATETOS (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) E SUBSTRATOS HETERÓLOGOS

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, como exigência final para obtenção do título de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal.

Orientador: Dr. Alexandre Rodrigues Silva - UFERSA

Co-orientadora: Dra. Alexsandra Fernandes Pereira - UFERSA

Mossoró - RN

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Biblioteca Central Orlando Teixeira (BCOT)

Setor de Informação e Referência

C198i Campos, Livia Batista

Interação *in vitro* entre espermatozoides de catetos (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) e substratos heterólogos/ Livia Batista Campos -- Mossoró, 2015.

85f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Rodrigues Silva

Co- Orientadora: Prof^a. Dra. Alexsandra F. Pereira

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação.

1. Animais Silvestres. 2. Membrana perivitelina. 3. Testes de interação *in vitro*. I. Título.

RN/UFERSA/BCOT /108-15

CDD: 636.9734

Bibliotecária: Vanessa Christiane Alves de Souza Borba

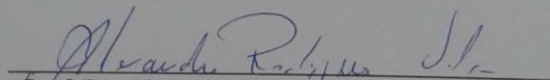
LÍVIA BATISTA CAMPOS

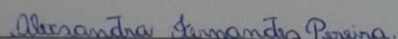
INTERAÇÕES *IN VITRO* ENTRE ESPERMATOZOIDES DE CATETOS (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) E SUBSTRATOS HETERÓLOGOS

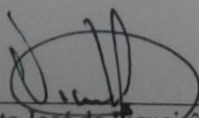
Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

APROVADA EM: 24 / 02 / 2015

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Alexandre Rodrigues Silva (UFERSA)
(Orientador)


Prof (a). Dra. Alexsandra Fernandes Pereira (UFERSA)
(Co-orientadora)


Prof. Dr. Vicente José de Albuquerque Freitas (UECE)

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

LÍVIA BATISTA CAMPOS – Nascida no Município de Catolé do Rocha - PB, no dia 05.12.1986, filha de Iraney Campos de Lima e Giselia Ferreira Batista Campos, concluiu o Ensino Médio no Colégio Técnico Dom Vital, PB. Graduiu-se em Medicina Veterinária pela Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) em 2012.2, onde foi bolsista PIVIC por seis meses e PIBIC por três anos. Durante a graduação, desenvolveu trabalhos sobre tecnologia de sêmen em catetos (*Pecari tajacu*) e monitoramento de ciclo estral em diferentes espécies silvestres. Em Dezembro de 2012 foi selecionado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (PPGA/UFERSA. Durante o período do mestrado, foi colaboradora na disciplina de Fisiopatologia da Reprodução do curso de Medicina Veterinária na mesma instituição.

A minha mãe, Giselia Ferreira Batista
Campos (Gicely) pelo amor
incondicional

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado forças para continuar essa caminhada, por nunca ter me abandonado e ter falado comigo inúmeras vezes, principalmente nos momentos que mais precisei.

Ao meu pai, Iraney Campos de Lima pela educação e amor.

À minha mãe, Giselia Ferreira Batista Campos (Gicely) pelo imenso amor, mimos, cuidados, exagerada dedicação e por entender minhas inúmeras ausências. Não existem palavras para agradecer tudo que fez e faz por mim. Sou eternamente grata por tudo. Te amo muito!!!

Às minhas irmãs, Vanessa Queli Batista Campos (Vaesca) e Tássia Queli Batista Campos (Taxinha) pelos mimos, carinhos e todo o cuidado mesmo à distância. Obrigada por sempre estarem preocupadas comigo, agradeço a Deus pelas irmãs e por ser a caçula da família. Amo vocês!!!

À minha filha, minha pequena gata Lucy, por todo o carinho e amor retribuído todos os dias a mim. Te adotar foi a melhor decisão que já fiz em minha vida. Mamãe te ama!

Ao meu orientador Prof.Dr. Alexandre Rodrigues Silva, pela paciência, oportunidades dadas e principalmente pelos ensinamentos durante toda a caminhada científica. Um exemplo de profissional que quero ser quando crescer. Sou eternamente grata.

À família LCGA (Laboratório de conservação e germoplasma animal – LCGA/UFERSA), em especial aos pós-graduandos: Thibério Castelo, Ana Liza Souza (Aninha), Gabriela Lima (Gaby), Gislaynne Peixoto (Gy), Keilla Moreira, Erika Camila Gurgel e Andréia Silva pela ajuda na execução do trabalho, pelos risos, conversas e todos os momentos compartilhados. Vocês foram essenciais.

À minha co-orientadora Prof^a.Dra.Alexsandra Fernandes Perreira por todo ensinamento, paciência, apoio e todo carinho. Você foi peça chave para a execução desse estudo. Muito obrigada por tudo!!!!

Ao Prof^o.Dr. Moacir Franco de Oliveira, pela disponibilidade dos animais, ajuda na execução do experimento e todo o apoio dado desde a iniciação científica.

Aos funcionários do CEMAS (Centro de multiplicação de Animais Silvestres – CEMAS/UFERSA), os quais foram essenciais para a execução desse trabalho.

À equipe do Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução (LFCR-UECE), primeiramente ao Prof^o Dr. Vicente Freitas, por ter permitido o treinamento e por te me recebido tão bem, aos pós-graduando Dowglish Chaves, Ianna Campelo e Joanna Souza por ter compartilhado seus conhecimentos e pelos grandes amigos que fiz Juliana Dantas, Samara Souza, Amanda Alburquerque, Rodrigo Letto. Meu sincero obrigada!!!

À equipe do Laboratório da Prof^a Dra. Nilza Dutra, por conceder os ovários de gatas para os primeiros treinamentos.

À equipe do Laboratório de Transplante Gonadal e Produção de Embriões *in vitro* (LIGPIV/UFERSA), em especial ao Prof^o Dr. Marcelo Barbosa por permitir a execução do cultivo *in vitro* em seu laboratório e por sempre me receber tão bem.

Aos funcionários do Abatedouro Frigorífico Industrial de Mossoró (AFIM), em especial ao Sr.Antônio por guardar todos os ovários e pela atenção.

Aos meus amores, Felipe Venceslau, Radan Elvis, Carlos Felipe Lira e Raony Moraes. Deus colocou quatro anjos em minha vida. Meninos lindos por dentro e por fora. Muito obrigada pelos fins de semana maravilhosos, pelas conversas, muitos risos e todo o cuidado e atenção nas horas que mais precisei. Admiro vocês!

A todos os meus familiares, tios (as), primos (as). por ficarem felizes com minha felicidade e a cada conquista na minha vida, por tornarem meus raros fim de semanas maravilhosos.

Às minhas lindas amigas catoleense, minhas irmãs, Kamila Almeida (Gorda) e Ana Paula Maia (Ana P.) pela amizade sincera, apoio, carinho, momentos vividos e conversas compartilhadas. Vocês tornaram meus fins de semanas inesquecíveis. Agradeço a Deus pelas amigas que tenho. Amo vocês!!!

Às amigas Valquíria Martins (Boneca de pano), Geysa Viena (Boy) e Maria Luiza Cesarina (Malu) pela amizade sincera, conselhos, risos, farras, conversas e apoio nos momentos difíceis. Amo vocês e sempre estarão no meu coração.

Aos componentes do grupo de oração da UFERSA, por ter me permitido sentir a presença de Deus, por ter renovado minhas forças e tornar essa caminhada mais fácil. Deus os abençoe!!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de mestrado.

“Disseste que nunca me deixaria
Disseste que a vida me abalaria
Disseste que no mundo eu teria aflições mas eu sei

Quando o mundo cai ao meu redor
Teus braços me seguram
Quando o mundo cai ao meu redor
És a esperança pra mim
Quando o mundo cai ao meu redor
E as forças se vão encontro abrigo em Ti
Segura-me
Segura em minhas mãos...

O choro dura uma noite
Mas quando o dia vem o sol
As tempestades virão
Mas sobre a morte Ele venceu
Ele venceu!”
André Valadão

**INTERAÇÕES *IN VITRO* ENTRE ESPERMATOZOIDES DE
CATETOS (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) E SUBSTRATOS
HETERÓLOGOS.** CAMPOS, Livia Campos. INTERAÇÕES *IN VITRO* ENTRE

ESPERMATOZOIDES DE CATETOS (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) E SUBSTRATOS HETERÓLOGOS. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal: Morfofisiologia e Biotecnologia Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2015.

RESUMO: Os testes convencionais, que avaliam a qualidade seminal, não possuem a capacidade de prever o potencial fecundante de uma amostra. Com o intuito de superar esse entrave, objetivou-se determinar a capacidade dos espermatozoides de catetos em promover interações com oócitos suínos recuperados de folículos antrais, bem como a capacidade de ligação à membrana perivitelina do ovo de galinha e identificação das relações dos mesmos com os parâmetros espermáticos. Para tanto, o estudo foi dividido em dois experimentos, sendo utilizados 11 catetos machos, oriundos do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS/UFERSA). Em todos os experimentos, o sêmen foi colhido por eletroejaculação e avaliado quanto à motilidade espermática, vigor, viabilidade, morfologia, parâmetros cinéticos por análise computadorizada (CASA), integridade e funcionalidade da membrana espermática. No primeiro experimento, as amostras de sêmen fresco foram analisadas pelo teste de interação *in vitro* com oócitos suínos em 5% CO₂ por 18 h a 38,5°C. Assim, verificou-se que em todos os oócitos avaliados existia a presença de interações com espermatozoides (média de 100 ± 0,0), tendo sido observado uma média de 19,85 ± 5,5 de oócitos com espermatozoides penetrados, 39,4 ± 4,6 espermatozoides ligados/oócito e 2,46 ± 0,7 espermatozoides penetrados/oócito. Ainda, observou-se uma significativa associação entre o número de espermatozoides ligados com índice de progressão (R=61,7%). No segundo experimento, o sêmen foi criopreservado em diluente a base de Tris, suplementado com gema de ovo (10%), *Aloe vera* (10%) e glicerol (3%). Após a descongelação, as amostras foram analisadas pelo teste de ligação à membrana perivitelina da gema do ovo de galinha, que foi realizado em atmosfera controlada contendo 5% CO₂ por 20 min a 38,5°C. As amostras de sêmen fresco apresentaram 140,6 ± 19,4 espermatozoides ligados a membrana perivitelina (taxa de variação de 33,9 – 308,7), já no sêmen congelado/descongelado, verificaram-se 125,1 ± 5,5 espermatozoides ligados (taxa de variação de 49,8 – 250,07) (P>0,05). Em adição, observou-se a existência de relações entre o teste de ligação e os parâmetros espermáticos: vigor (54,6%), deslocamento lateral da cabeça (R=55,1%), frequência de batimento cruzado (R=76,8%), índice de progressão (R=61,8%) e índice de linearidade (R=62,2%). Diante disso, conclui-se que ambos os testes podem ser utilizados para a avaliação funcional dos espermatozoides de catetos. Ainda, o teste de ligação à membrana perivitelina é um método confiável, prático e relativamente simples e que pode ser eficientemente incorporado à análise de rotina de amostras de sêmen catetos.

Palavras-chave: Animais silvestres, teste de interação *in vitro*, membrana perivitelina

IN VITRO INTERACTIONS BETWEEN COLLARED PECCARIES (*Pecari tajacu* LINNAEUS, 1758) SPERMATOOA AND HETEROLOGOUS SUBSTRATES. CAMPOS, Livia Batista. *In vitro* interactions between collared peccaries (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) spermatozoa and

heterologous substrates. 2015. Thesis (Master degree in Animal Science: Morphophysiology and Animal Biotechnology) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2015.

ABSTRACT: Conventional tests that evaluate sperm quality do not have the ability to measure the potential of a fertilizing sample. This study aimed to determine the ability of the collared peccary of sperm in interacting with swine oocytes recovered from antral follicles, perivitelline membrane binding capacity of the chicken egg, and finally identify relationships between sperm parameters and *in vitro* interaction tests. Thus study was divided in two experiments with 11 male collared peccaries from the Multiplication Center of Wild Animals (CEMAS/UFERSA). In all experiments, the semen was collected by electroejaculation and evaluated for motility, vigour, viability, normal morphology, membrane integrity, and kinetic motility parameters by CASA. In the first experiment, semen samples were analyzed by an *in vitro* interaction test with swine oocytes conducted under a humidified atmosphere containing 5% CO₂ for 18 h at 38.5°C. Thus, it was found that in all oocytes there interactions with the presence of spermatozoa (mean 100.00 ± 0.0), observed the mean of 19.85 ± 5.5 oocytes penetrated by spermatozoa, number bound spermatozoa 39.4 ± 4.6 and penetrated spermatozoa 2.46 ± 0.7. Also, verified a significant association between the number of bound sperm and straightness (STR) (R²=61.7%; P=0.04). In the second experiment, semen samples were frozen in a Tris-based extender plus egg yolk (10%), *Aloe vera* (10%) and glycerol (6%). After thawing, samples were analyzed by an egg perivitelline membrane biding test conducted under a humidified atmosphere containing 5% CO₂ for 20 min at 38.5°C. As result, we identify 140.6 ± 19.4 sperm bound to the perivitelline membrane to fresh samples (binding range 33.9 – 308,7), while in frozen-thawed samples, a total of 125.1 ± 5.5 sperm were found (binding range 49.8 – 250.7) (P>0.05). Significant associations between frozen/thawed sperm bound to perivitelline membrane and various sperm parameters as vigor (54.6%), amplitude lateral head (R=55.1%), beat cross frequency (R=76.8%), straightness (R=61.8%) and linearity (R=62.2%) were found. In conclusion, that the two tests can be used for the functional evaluation of peccaries sperm. The perivitelline membrane binding test is a reliable, practical and relatively simple method that does not require expensive equipment and can be efficiently incorporated into the routine analysis of peccaries semen samples.

Key-words: Wildlife, *in vitro* interaction test, perivitelline membrane.

LISTAS DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

μL	Microlitro
μm	Micrômetros

$\mu\text{m/s}$	Micrômetro por segundos
$\mu\text{g/mL}$	Micrôgrama por mililitro
ALH	Deslocamento lateral da cabeça
BCF	Frequência de batimento cruzado
BOD	Incubadora biológica com demanda de oxigênio
BTS	Beltsville Thawing Solution
BSA	Albumina sérica bovina
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Cloreto de cálcio diidratado
CASA	Análise Computadorizada do Sêmen
CEUA	Comitê de Ética em Uso de Animais
CEMAS	Centro de Multiplicação de Animais Silvestres
C-FDA	6-carboxifluoresceína diacetato
CO_2	Dióxido de carbono
COCs	<i>Complexo cumulus-oócito</i>
DPBS	Solução Fosfatada Tamponada Dulbecco
DIC	Diacetato de carboxifluoresceína
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
GI	Grau I
GII	Grau II
GIII	Grau III
GIV	Grau IV
HOST	Teste hiposmótico
ICMBIO	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
IP	Iodeto de Propídio
IUCN	União Internacional de Conservação da Natureza
LIN	Índice de linearidade
KCl	Cloreto de potássio
m	Metro
MgCl_2	Cloreto de Magnésio
mg/kg	Miligrama por kilograma
mg/mL	Miligrama por mililitro
Min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mOsm/L	Miliosmol por litro
NaCl	Cloreto de Sódio
NaHCO_3	Bicarbonato de sódio
NaH_2PO_4	Dihidrogeno fosfato de sódio
SD	Desvio padrão
STR	Índice de progressão
VAP	Velocidade do percurso médio
VCL	Velocidade do percurso curvilíneo
VSL	Velocidade em linha reta

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1 – Média ($\pm$ S.D.) das características do sêmen fresco e congelado/descongelado coletado de catetos adultos por eletroejaculação (n=11 ejaculados).....	48
Tabela 2 – Parâmetros de motilidade espermática (mean $\pm$ S.D.) observado em sêmen fresco de catetos (n = 11) por análise computadorizada (CASA).....	49
Tabela 3 – Interação entre espermatozoides fresco de catetos (n = 11) e oócitos suínos após 18 h de incubação.....	50

Capítulo 2

Tabela 1 – Média ($\pm$ S.D.) das características do sêmen fresco e congelado/descongelado coletado de catetos adultos por eletroejaculação (n=11 ejaculados).....	64
Tabela 2 – Parâmetros de motilidade espermática (mean $\pm$ S.D.) observado em sêmen fresco e congelado/descongelado de catetos (n = 11) por análise computadorizada (CASA).....	65
Tabela 3 – Média ($\pm$ S.D.) e variação de ligação do espermatozoide de catetos a membrana perivitelina em amostras de sêmen fresco e congelado/descongelado (n = 11).....	66
Tabela 4 – Análise de regressão linear para avaliar a relação de características com o número de espermatozoides fresco e congelado/descongelado ligada à membrana perivitelina.....	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Cateto (<i>Pecari tajacu</i>) criados em sistema intensivo no Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS/UFERSA)	18
Figura 2 – Espermatozoides de catetos (<i>Pecari tajacu</i>) ligados a zona pelúcida de oócitos de suínos (A) e membrana perivitelina (B).....	80

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	16
-------------------	----

2. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1.1. TECNOLOGIA DE SÊMEN: ESTADO DA ARTE EM CATETOS (<i>Pecari tajacu</i>)	19
2.2. MÉTODOS CONVENCIONAIS DE AVALIAÇÃO SEMINAL	21
2.2.1. Motilidade e vigor espermático.....	21
2.2.2. Análise Computadorizada do Sêmen (CASA).....	22
2.2.3. Morfologia espermática	22
2.2.4. Integridade Funcional da Membrana Plasmática.....	23
2.2.5. Integridade Estrutural da Membrana Plasmática	24
2.3. TESTE <i>IN VITRO</i> PARA AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO ESPERMÁTICA.....	25
2.3.1. Teste de penetração <i>in vitro</i> com oócitos heterólogos	26
2.3.2. Uso da membrana perivitelina do ovo de galinha.....	27
3. JUSTIFICATIVA.....	29
4. OBJETIVOS.....	30
4.1. Objetivo Geral.....	30
4.2. Objetivos Específicos.....	30
5. REFERÊNCIAS.....	31
CAPÍTULO 1 – ESTIMATING THE FERILIZING ABILITY OF COLLARED PECCARIES (<i>Pecary tajacu</i>) SPERM BY ANALYSING ITS INTERACTION WITH SWINE OOCYTES.....	40
CAPÍTULO 2 – IMPLEMENTING THE EGG PERIVITELLINE MEMBRANE BIDDING TEST FOR THE ANALYSIS OF FRESH AND FROZEN-THAWED SPERM DERIVED FROM COLLARED PECCARIES (<i>Pecari tajacu</i>)	57
CONSIDERAÇÕES GERAIS E PERSPECTIVAS	77
ANEXOS.....	78

1. INTRODUÇÃO

A caatinga possui uma grande diversidade de espécies animais, dentre as quais algumas são caçadas pela população local, uma vez que representam fonte alternativa de proteínas (SILVA et al., 2010). Nesse contexto, incluem-se os catetos (*Pecari tajacu*), classificados recentemente como espécie vulnerável à extinção nos biomas Caatinga e Mata Atlântica (ICMBio, 2014), sendo contudo, considerados uma espécie de população estável pela União Internacional de Conservação da Natureza (IUCN, 2014).

Em geral, essa espécie adapta-se facilmente às condições de cativeiros, que aliado ao interesse econômico internacional pela sua carne e pele, tem motivado produtores a investir na sua exploração comercial (NOGUEIRA & NOGUEIRA-FILHO, 2011). Além disso, o crescente interesse por catetos também favorece a conservação e gerenciamento da biodiversidade local, tornando-se uma solução para o aproveitamento de áreas improdutivas em propriedades rurais (ALBUQUERQUE et al., 2007). Contudo, o sucesso dessa visão de criação econômica implica em um bom conhecimento da biologia da espécie, bem como de seu comportamento e aspectos reprodutivos relacionados a ambos os sexos (SANTOS, 2000).

Nesse contexto, estudos em catetos vêm sendo desenvolvidos objetivando conhecer as principais características reprodutivas, buscando a conservação dos germoplasmas masculino e feminino (CASTELO et al., 2010; SILVA, 2012; PEIXOTO et al., 2012; MAIA et al., 2014). Em especial, várias pesquisas foram realizadas na otimização de métodos de avaliação seminal, como a análise da morfologia espermática (SOUSA et al., 2013), integridade estrutural e funcional da membrana (SANTOS et al., 2011; SOUSA et al., 2014) e análise computadorizada, CASA (CASTELO et al., 2010), porém essas avaliações ainda não foram correlacionadas com parâmetros relativos à capacidade fecundante espermática. Assim, a busca por técnicas rápidas, eficazes e seguras para se avaliar esta característica representa um dos grandes desafios dentro da biotecnologia reprodutiva, especialmente em espécies silvestres (LUZ et al., 2000).

Diante do contexto, testes *in vitro* vêm sendo realizados em outras espécies no sentido de prever a capacidade fecundante do espermatozoide, dentre os quais se pode exemplificar o teste de interação *in vitro*. O referido teste permite avaliar várias funções do espermatozoide simultaneamente, incluindo motilidade, capacidade de reconhecimento e ligação à zona pelúcida, ocorrência da reação acrossômica e,

finalmente, penetração na zona pelúcida (LANDIM-ALVARENGA et al., 2001; LIU & BAKER, 2002). Adicionalmente, relaciona-se que o número de espermatozoides ligados à zona pelúcida e os que se encontram no espaço perivitelino é considerado proporcional à capacidade fecundante dos espermatozoides (CODDE & BERGER, 1995). Finalmente, os testes de interação *in vitro* possuem ainda a capacidade de identificar alterações nos espermatozoides, quando comparado aos testes convencionais (MACEDO et al., 2006; MARTINEZ et al., 1993).

Apesar da eficiência dos testes de interação *in vitro*, sua principal limitação consiste na disponibilidade de oócitos de boa qualidade e quantidade suficiente (TABERNER et al., 2009). Nesse contexto, o uso de oócitos heterólogos e/ou a membrana perivitelina do ovo de galinha são substratos interessantes para atender essa necessidade. Em geral, o teste de penetração *in vitro* com oócitos heterólogos representa um método mais exequível quando comparado com estruturas homólogas, além de não requerer o uso dos valiosos oócitos, principalmente em se tratando de espécies silvestres (TABERNER et al., 2009; KOUBA et al., 2001). O teste de ligação do espermatozoide à membrana perivitelina da gema de ovo permite verificar a capacidade fecundante da célula espermática em virtude das similaridades entre as glicoproteínas da zona pelúcida e da membrana perivitelina (BARBATO et al., 1998).

Portanto, a combinação da análise seminal convencional associada com os resultados de testes de interação *in vitro* utilizando substratos heterólogos permitiria fornecer um procedimento viável para prever a capacidade fecundante de amostras de sêmen de catetos, como já anteriormente relatado em amostras de sêmen de rato-do-chão (*Calomys laucha*) (CORCINI et al., 2011), felinos em extinção (*Leopardus pardalis* e *Leopardus tigrinus*) (BAUDI et al., 2008), equinos (CHOI et al., 2003) e asno Catalão (TABERNER et al., 2009).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Tecnologia de sêmen: Estado da arte em catetos (*Pecari tajacu*)

Os catetos (Figura 1) pertencem a sub-ordem Suiformes, família Tayassuidae, juntamente com duas outras espécies, o queixada (*Tajassu pecari*) e o pecari do Chaco (*Catagonus wagneri*) (SOWLS, 1997). Essa espécie é exclusiva das Américas, habita desde o sul dos Estados Unidos até o Norte da Argentina, estando presente em praticamente todos os biomas (SANTOS et al., 2000).



Figura 1 – Cateto (*Pecari tajacu*) criados em sistema intensivo no Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS/UFERSA). Fonte: CEMAS

Segundo um levantamento realizado pelo Instituto Chico Mendes de Conservação de Biodiversidade (ICMBio), observou-se que no Brasil, os catetos ocupam um status de menor preocupação em termos de um possível risco de extinção em praticamente todos os biomas, sendo classificados como estáveis, exceto na Mata Atlântica e Caatinga, no qual a espécie é considerada como vulnerável à extinção (ICMBio, 2014). Devido a esta situação, estratégias de conservação desta espécie são requeridas. Além disso, esta afirmativa aliada à fácil adaptação em cativeiros, possibilita a criação comercial de catetos, com o intuito de diminuir a caça predatória e fornecer uma fonte alternativa de proteínas para a população. Para tanto, faz-se necessária a aplicação de programas de

reprodução em cativeiros com o uso de biotécnicas de reprodução assistida como ferramentas para garantir a conservação do material genético, pelo estabelecimento de bancos de germoplasma (WILDT et al., 1995; SILVA et al., 2012).

Nos últimos anos, vários estudos têm sido desenvolvidos no intuito de aumentar o conhecimento nessa área (PEIXOTO et al., 2012; SOUZA et al., 2014). Especificamente, quanto à criopreservação de gametas masculinos, vários protocolos de congelamento foram estabelecidos (CASTELO et al., 2010, SILVA et al., 2012; ALVES et al., 2013), bem como métodos de avaliação seminal (SANTOS et al., 2011; SOUSA, 2014; CASTELO et al., 2010), resultando em avanços significativos no estudo de várias espécies.

No que se refere à análise das características seminais, HELLGREN et al. (1989) identificaram nos catetos três frações existentes no ejaculado. A primeira fração é límpida, a segunda considerada rica em espermatozoides e a terceira é a fração gel. Nessa espécie já foram realizadas com sucesso colheitas de sêmen por eletroejaculação, usando diferentes protocolos anestésicos, como a associação da tiletamina-zolazepam, propofol e associação do mesmo com o atipamezole e medetomidine. Esses trabalhos demonstraram que o propofol sozinho apresentou uma maior eficiência para obtenção de espermatozoides viáveis (SOUZA et al., 2009; PAIVA et al., 2014). De acordo com PEIXOTO et al. (2012) em estudos realizados em catetos criados no Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS), localizado no Nordeste do Brasil (Mossoró, RN, Brasil; 5°10'S, 37°10'W), o ejaculado obtido por eletroejaculação apresenta volume médio de 3,5 mL, com concentração de $0,8 \times 10^6$ espermatozoides /mL, possuindo motilidade de 85,1% com 86,3% de espermatozoides vivos, 79,9% de células morfolologicamente normais e 76,9% de acrossoma íntegro. No tocante à morfometria, o espermatozoide da espécie apresentou cabeça com 6 µm de comprimento, 4 µm de largura, peça intermediária e cauda medindo $11,17 \pm 1,7$ µm e $26,56 \pm 1,99$ µm de comprimento, respectivamente (SOUZA, 2009).

Recentemente, Lago et al., (2014) realizaram a refrigeração do sêmen de catetos a 5°C comparando o diluente a base de tris-gema 20% com tris adicionado de extrato de *Aloe vera* a 20%. Mostraram assim que a gema de ovo mantém a qualidade espermática por até 36h e a *Aloe vera* surge como uma alternativa para a refrigeração por períodos mais curtos (24h), ambos sendo possíveis como protetores a serem utilizados em programas de reprodução assistida, obedecendo ao tempo de preservação de cada.

A primeira criopreservação de sêmen com sucesso para essa espécie foi relatada por CASTELO et al. (2010), utilizando um diluente à base de Tris suplementado de gema de ovo (20%) e glicerol (3%), tendo sido alcançados apenas 30% de motilidade progressiva após o aquecimento. Em estudo posterior, ALVES et al. (2013), utilizando um diluente à base de Tris, avaliaram diferentes concentrações de gema de ovo (5, 10 e 20%) combinado com concentração de glicerol (3 e 6%). Os autores recomendaram o uso de diluente à base de Tris adicionado de 10 ou 20% de gema de ovo e 3% de glicerol.

No intuito de aprimorar o protocolo de criopreservação de sêmen de catetos, SILVA et al. (2012) avaliaram o uso de diluente a base de água de coco em pó (ACP-116C[®]) acrescida de diferentes concentrações de glicerol (1,5 ou 3%) e gema de ovo (10 ou 20%). Nesse estudo, verificou-se que o ACP-116C[®] adicionado de 20% de gema de ovo e 3% de glicerol proporcionou melhores resultados de motilidade ($48,3 \pm 6,1\%$) e vigor ($2,8 \pm 0,2$) após aquecimento.

Na busca de um processo de criopreservação ideal, aliado a necessidade no controle de doenças, levando assim a supressão de substâncias de origem animal em meios de conservação de sêmen e garantia da segurança sanitária nos processos biológicos (BOUSSEAU et al., 1998; SAMPAIO NETO et al., 2002), sugeriu-se a utilização de produtos de origem vegetal. Dentre as vantagens do uso desses produtos, destacam-se a presença de substâncias similares aos crioprotetores convencionais, simplicidade de manipulação e amplamente distribuídos na natureza, além de não causarem danos irreversíveis à célula. Como exemplo, tem-se a *Aloe vera* (SKINNER, 1997; BOUDREAU & BELAND, 2006). Assim, SOUZA et al., (2014) testaram diferentes concentrações de *Aloe vera* em combinação com gema do ovo (20% de *Aloe vera* na ausência e presença de 10% de gema de ovo). Esses autores sugeriram que o uso da *Aloe vera* associado à gema de ovo pode ser um protocolo eficaz para criopreservação de sêmen de catetos, no qual obtiveram média de $54 \pm 6,2\%$ de motilidade em comparação com $30,6 \pm 4,2\%$ (20% de *Aloe Vera*) e $27,8 \pm 70\%$ (10% de gema de ovo).

A realização de estudos que busquem o aprimoramento da criopreservação de sêmen de catetos é de grande importância para a obtenção de espermatozoides viáveis necessários para o aumento das taxas de fertilidade. Contudo, faz-se necessário estabelecer avaliações precisas tanto do sêmen fresco quanto criopreservado no intuito de analisar a capacidade fecundante, conhecendo-se a extensão dos danos causados a célula

espermática pela ação deletéria, direta e/ou indiretamente, causada pela criopreservação em termos de atividade fecundante.

2.2. Métodos de avaliação seminal

Uma vez colhido o sêmen, o mesmo inicialmente deve ter sua qualidade avaliada com base em parâmetros macroscópicos, como aparência, cor, volume e turbidez. Posteriormente, seguem as análises subjetivas de motilidade, concentração, morfologia e integridade de membranas plasmática e acrossomal (ZAMBELLI & CUNTO, 2006; PAPA et al., 2000).

Contudo, para mensurar a fertilidade de uma amostra seminal a análise isolada de um parâmetro não é capaz de atingir esse objetivo (ARRUDA & CELEGHINI, 2003), sendo necessário avaliar vários aspectos do sêmen em uma análise multifatorial, para determinar uma maior ou menor fertilidade potencial do macho (SIQUEIRA et al., 2007).

2.2.1. Motilidade e vigor espermático

A avaliação da motilidade espermática é uma análise importante, pois é uma ferramenta essencial para predizer a migração dos espermatozoides no trato reprodutivo da fêmea, visando à interação dos gametas na fecundação (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2005; SUAREZ & PACEY, 2006).

Para avaliar a cinética do movimento espermático de forma subjetiva utiliza-se a microscopia ótica, consistindo assim num método simples e de baixo custo; contudo, pode apresentar grande variabilidade (GARNER et al., 1997).

Em adição, o vigor espermático é um parâmetro avaliado em conjunto com a motilidade e definido como a qualidade do movimento exibido pelos espermatozoides móveis. Para tanto, faz-se uso de uma escala compreendida numa faixa de 0 a 5 (JOHNSTON et al., 2001; ZAMBELLI & CUNTO, 2006).

Esses dois parâmetros são necessários para predizer a capacidade de penetração dos espermatozoides. Contudo, existem evidências de que tais parâmetros isoladamente não são suficientes para determinar a fertilidade de um ejaculado, pois, espermatozoides com boa motilidade podem ser incapazes de fecundar um oócito, caso apresentem danos acrossomais (SALAMON & MAXWELL, 2000). Adicionalmente, estudos à respeito da relação entre a motilidade e fertilidade ainda são conflitantes (NOTHLING et al., 1995, GADEA et al., 1998, SIQUEIRA et al., 2007).

2.2.2. Análise Computadorizada do Sêmen (CASA)

Dentre os métodos de avaliação seminal, o CASA tem sido o mais utilizado para avaliação objetiva, fornecendo informações precisas e significativas da cinética dos espermatozoides, presentes no ejaculado, baseando-se na avaliação individual da célula espermática (MORTIMER, 1997; COX et al., 2006).

Os parâmetros comumente obtidos através de analisadores computadorizados de sêmen são: velocidade do percurso curvilinear (VCL), velocidade do percurso médio (VAP), velocidade em linha reta (VSL), índice de progressão (STR), índice de linearidade (LIN), frequência de batimento cruzado (BCF) e deslocamento lateral da cabeça (ALH) (MORTIMER, 1997; VERSTEGEN et al., 2002). Os três parâmetros de velocidade (VCL, VAP, VSL) são comumente utilizados para descrição geral do movimento do espermatozoide, contudo, para uma avaliação adicional, foram estabelecidos os parâmetros STR e LIN que tratam das relações entre estas velocidades (MORTIMER, 1997).

Vários estudos têm sido realizados na tentativa de correlacionar parâmetros cinéticos e fertilidade (KJAESTAD et al., 1993; SANCHEZ-PARTIDA et al., 1999; TARDIF et al., 1999). Os autores identificaram que alguns valores dos parâmetros observados pela CASA podem estimar a fertilidade *in vitro*, como relatado em bovinos (LOSANO et al., 2015), canídeos (SILVA et al., 2006) e humanos (TARDIF et al., 1999). CASTELO et al. (2010) demonstraram pela primeira vez a análise da cinética espermática de catetos, contudo, tais resultados não foram correlacionado com a fertilidade.

2.2.3. Morfologia espermática

Como apenas os espermatozoides viáveis são capazes de interagir com o oócito e iniciar o processo de fecundação (WALTERS et al., 2004), admite-se que os danos específicos na morfologia estrutural das células espermáticas correlacionam-se com a sub e infertilidade animal (PESH & BERGMANN, 2006).

Para se avaliar a morfologia espermática, faz-se uso de diversos corantes como eosina-nigrosina (DOTT & FOSTER, 1972), Spermac (OETTLÉ, 1993), rosa de bengala (RODRIGUES, 1997), giemsa (CARDOSO et al., 2003), hematoxilina-eosina (SILVA et al., 2003) e azul de bromofenol (DERIVAUX, 1980).

Na avaliação desse parâmetro, existem dois principais métodos de classificação das alterações morfológicas. Um deles é dividido em alterações primárias, relacionadas a problemas na espermatogênese, e secundárias, quando os problemas estão relacionados a maturação no epidídimo ou devido a errônea manipulação, seja esta durante o processamento, resfriamento, congelamento ou descongelamento (JOHNSTON et al., 2001) e a segunda em defeitos maiores e menores (OETTLÉ, 1993). Além disso, pode-se dividir os defeitos em maiores e menores, quanto à região do espermatozoide em que esta situada a alteração, ou seja, cabeça, peça intermediária e cauda (CARDOSO, et al., 2003). Apesar da grande importância da morfologia espermática, vários autores relataram que este parâmetro tiveram relação positiva com a fertilidade, como verificado bovino (SODERQUIST et al., 1991) e em suíno (Gadea et al., 1998).

Em catetos, a avaliação morfológica dos espermatozoides já foi estabelecida, na qual autores analisaram o uso de três diferentes métodos de coloração (rosa de bengala vs. azul de bromofenol vs. eosina-nigrosina) e recomendaram o uso do corante rosa de bengala para a avaliação morfológica espermática (SOUSA et al., 2013). Contudo, a referida avaliação não foi correlacionada com a capacidade de penetração *in vitro*.

2.2.4. Integridade funcional da membrana plasmática

O teste hiposmótico (HOST) consiste numa método simples, econômico e com adequada viabilidade e repetibilidade para avaliar a funcionalidade da membrana plasmática dos espermatozoides (MATSUOKA et al., 2006).

Esse método foi desenvolvido por JEYEDRAN et al. (1984) e consiste em submeter os espermatozoides a uma incubação em solução hipo-osmótica. Assim, estando intacta a membrana espermática, ocorre o influxo de água até que seja atingido o equilíbrio osmótico. Como consequência desse processo, a membrana se expande causando o enrolamento da cauda. Contudo, se a membrana estiver danificada, essa reação não é visualizada.

Esse parâmetro é uma característica importante para os vários eventos fisiológicos que ocorrem antes e durante a fecundação (capacitação, ligação à zona pelúcida, reação acrossômica e fusão dos gametas). Além disso, espera-se que quanto mais espermatozoides preservarem esta característica, melhor será a qualidade do sêmen (NIE & WENZEL, 2001). Contudo, quando relacionado com a fertilidade *in vitro*, foi

observado relação positiva em bovina (CORREA et al., 1997), humanos (JEYEDRAN et al., 1992) e suíno (PÉREZ-LLANO et al., 2001).

Em catetos, soluções hiposmóticas com diferentes osmolaridades (0, 50, 100, 150, 200 mOsm/L) foram testadas para a avaliação funcional da membrana espermática. Os autores concluíram que a água destilada (0 mOsm/L) aparenta ser uma solução adequada para o uso no teste hiposmótico (SANTOS et al., 2013). Porém, não existem estudos da correlação entre essa avaliação e a capacidade de penetração *in vitro* dos espermatozoides nessa espécie.

2.2.5. Integridade estrutural da membrana plasmática

A integridade da membrana plasmática, é um pré-requisito para que ocorram os eventos fisiológicos relacionados ao processo de fecundação (PAPA et al., 2000). Para a avaliação desse parâmetro têm sido empregados vários testes, como as colorações supra-vitais, incluindo azul de bromofenol e eosina-nigrosina. Além desses, podem também ser empregados marcadores fluorescentes, como iodeto de propídio (IP), diacetato de carboxifluoresceína (DIC), que atuam através de reações com enzimas citoplasmáticas (ARRUDA, 2004; TARTAGLIONE & RITTA, 2004)

Contudo, está informação na estrutura da membrana plasmática e a relação com a fertilidade permanece por ser melhor esclarecida (PEÑA 2000, GADEA et al., 1998). Essa afirmativa pode ser explicada provavelmente porque esse parâmetro fornece informações sobre a viabilidade do espermatozoide, mas não sobre a sua funcionalidade em termos de capacitação, reação acrossômica e ligação com o oócito.

Em catetos, a avaliação da integridade da membrana plasmática por meio de marcadores fluorescentes foi descrita por SOUZA et al. (2014), quando os autores realizaram a validação dos fluoróforos (IP e DIC). Contudo, não há informações sobre a correlação desse parâmetro com a fertilidade em sêmen desta espécie.

Nesse contexto, os parâmetros convencionais utilizados na avaliação espermática sozinhos não são capazes de prever a fertilidade de uma amostra de sêmen, uma vez que tais métodos apresentam baixa associação com a fertilidade (MACEDO et al., 2006). Portanto, é possível que, eventualmente machos subfêrteis sejam usados em programas de reprodução. Desta forma, o desenvolvimento de testes *in vitro* vem sendo proposto,

com o objetivo de identificar com exatidão a capacidade de penetração *in vitro* de amostras seminais.

2.3. Testes *in vitro* para avaliação da interação espermática

Dentre os testes *in vitro* propostos, tem-se a fecundação *in vitro*, FIV (COETZEE et al., 1998), testes de ligação e penetração à zona pelúcida utilizando oócitos homólogos e heterólogos (WABERSKI et al., 2005) e teste de ligação à membrana perivitelina do ovo de galinha (BARBATO et al., 1998). Tais testes podem ser utilizados como ferramenta para determinar a habilidade do espermatozoide em sofrer a reação acrossomal, ligar-se à zona pelúcida e penetrar na membrana do oócito (BRACKETT et al., 1982).

A FIV é o método mais adequado para avaliar a capacidade fecundante dos espermatozoides, permitindo a avaliação da interação entre os gametas da mesma espécie (COETZEE et al., 1998). Alguns autores obtiveram sucesso no uso da FIV para prever a fertilidade do macho, utilizando oócitos intactos (ovinos: PAPADOPOULOS et al., 2005; asno Catalão: TABERNER et al., 2009; suíno: PELAEZ et al., 2006). Contudo, esta técnica não pode ser utilizada como avaliação de rotina devido aos custos, ao tempo necessário para a sua execução e a necessidade da disponibilidade de oócitos homólogos (COETZEE et al., 1998).

Já o teste de ligação utilizando oócitos homólogos depende das moléculas de superfície do espermatozoide e seus locais de ligação com a zona pelúcida (CENSYRA, 1994), avaliando indiretamente os danos no complexo sistema de proteínas, glicoproteínas e carboidratos, sistema este que permite a interação com o oócito (HAY et al., 1997). Esse teste permite avaliar várias funções do espermatozoide simultaneamente, incluindo a habilidade do espermatozoide em sofrer a reação acrossomal, ligar a zona pelúcida e penetrar na membrana do oócito, que indiretamente possibilita a avaliação de diversas características do sêmen (LANDIM-ALVARENGA et al., 2001; LIU & BAKER, 2002). Adicionalmente, podem identificar muitos danos espermáticos em nível molecular, o que não é possível ao avaliar com a análise convencional (STROM-HOLST et al., 2001).

O número de espermatozoides ligados à zona pelúcida e os que se encontram no espaço perivitelino é considerado proporcional à capacidade fertilizante dos espermatozoides (CODDE & BERGER, 1995). Além disso, ambas as técnicas são menos demoradas em comparação com a técnica de FIV, pois a maturação do oócito não é um

passo necessário, somente a penetração do espermatozoide e não a continuação do desenvolvimento é avaliada (HEWIT & ENGLAND, 1997).

Para a realização do teste de ligação e penetração *in vitro* faz-se necessário uma quantidade adequada de oócitos homólogos, na qual constitui um requerimento difícil de satisfazer para certos animais domésticos e, principalmente, silvestres. Em adição, são testes relativamente trabalhosos e onerosos, inviabilizando a utilização na rotina de centrais de inseminação artificial (CORCINI, 2010). Consequentemente, a utilização do teste de penetração *in vitro* com oócitos heterólogos surge como uma alternativa para a avaliação da capacidade fecundante de sêmen fresco ou criopreservado em espécies de pouca disponibilidade de oócitos, uma vez que não requer o uso dos valiosos gametas homólogos (KOUBA et al., 2001).

BARBATO et al. (1998) desenvolveram o teste de ligação à membrana perivitelina do ovo de galinha, no intuito de simulando a interação dos gametas, avaliando a capacidade fecundante dos espermatozoides. O referido teste apresentou a vantagem de ser de fácil obtenção, menos dispendiosa e diminuição do efeito fêmea, uma vez que diferentes amostras de sêmen podem ser incubadas sobre fragmentos de uma mesma membrana (AMORIM, 2008).

2.3.1. Teste de penetração *in vitro* com oócitos heterólogos

O teste de penetração *in vitro* utilizando oócitos heterólogos surgiu como um método de avaliação da capacidade fecundante do sêmen fresco e congelado, no qual os gametas femininos são de animais com maior disponibilidade de oócitos (TABERNER et al., 2009). Dentre as espécies que podem ser fornecedoras de oócitos, tem-se animais de laboratório, como o hamster (HANADA & CHANG, 1972; YANAGIMACHI et al., 1976) ou espécies domésticas obtidos *post-mortem* em abatedouros (COMIZZOLI et al., 2001).

A eficiência do teste de penetração *in vitro* utilizando oócitos heterólogos já foi descrita em humanos (YANAGIMACHI et al., 1976), felinos em extinção (*Leopardus pardalis* e *Leopardus tigrinus*) (BAUDI et al., 2008), bovinos não domésticos (*Bos bison*, *Bos gaurus*, *Bos grunniens*, e *Bos javanicus*) (MCHUGH & RUTLEDGE, 1998), equinos (CHOI et al., 2003), asnos (TABERNER et al., 2009) e *Calomys laucha* (ZHAO et al., 2002) com resultados satisfatórios.

Além disso, alguns autores utilizaram oócitos bovinos para avaliar a capacidade de penetração de espermatozoides caprinos (COX et al., 1994), antílope (KOUBA et al., 2001) e *Bison bonasus* (PÉREZ-GARNELO et al., 2006) demonstrando que nas mesmas condições os resultados encontrados com a fecundação heteróloga foram similares aos observados com a fecundação homóloga. Essa afirmativa confirma que a interação dos gametas heterólogos poder ser aplicada ao sistema homólogo, sendo útil para mimetizar o processo de fecundação com mais precisão e reduzida exigências de trabalho no ensaio de penetração *in vitro*.

Sendo considerados filogeneticamente mais próximos aos catetos, os suínos tem sido rotineiramente abatidos em abatedouros locais, tornando-se uma fonte de oócitos disponível e de baixo custo. Portanto, o teste de penetração *in vitro* utilizando oócitos heterólogos apresenta-se como uma possível técnica para avaliação da capacidade de fecundação de espermatozoides frescos ou congelados de catetos em oócitos suínos.

2.3.2. Uso da membrana perivitelina do ovo de galinha

O teste de ligação *in vitro* pela membrana perivitelina do ovo de galinha surge como uma alternativa para a seleção de machos com maior potencial fecundante, em virtude da semelhança entre glicoproteínas ortólogas da zona pelúcida de oócitos de mamíferos e as proteínas da camada perivitelina dos ovos de galinha (BARBATO et al., 1998). Deste modo, os espermatozoides com maior capacidade de penetração nesta membrana também apresentariam maior capacidade fecundante, quando em contato com oócitos homólogos (MUGNIER et al., 2009).

Estudos já foram realizados em sêmen de galos, humanos (ROBERTSON et al., 1997), camundongos (BARBATO et al., 1998), suínos (CORNICI et al., 2012), caprinos (SANTOS, 2010), gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*) (GARAY, 2012) e canídeos (CSERMAK JUNIOR, 2011), no intuito de identificar a capacidade fecundante dos machos, utilizando a ligação dos espermatozoides à membrana perivitelina. Adicionalmente, esse teste torna-se uma ferramenta útil para avaliar os danos aos espermatozoides causados pelo processo de criopreservação, já descrito em sêmen humano (AMANN et al., 1999), bovino (LOSANO et al., 2015) e caprino (SANTOS, 2010).

O uso da membrana perivitelina tem como vantagens permitir o teste de diferentes lotes de sêmen sobre um mesmo substrato, ou seja, diferentes fragmentos de uma mesma

membrana, minimizando a variação ocorrida ao teste pelo efeito fêmea, além da fácil obtenção da membrana e menos dispendiosa que os oócitos (CSERMAK JUNIOR, 2011). Adicionalmente, o teste de ligação com a membrana perivitelina é simples e de fácil obtenção (AMORIM, 2008). Ainda, espera-se uma maior uniformização das respostas de um mesmo indivíduo, aumentando assim a probabilidade de observar diferenças entre indivíduos (BARBATO et al., 1998).

Assim, diante da dificuldade da obtenção de uma quantidade satisfatória de oócitos de catetos aliado ao sucesso do teste de penetração usando membrana perivitelina do ovo de galinha em outras espécies, sugere a realização desses testes que predigam o potencial de fertilidade de uma amostra de sêmen fresco e criopreservado. Em adição, a combinação de análise de sêmen convencional com os resultados de testes de penetração *in vitro* deve fornecer um método viável para avaliar a capacidade fecundante de amostras de sêmen em catetos.

3.JUSTIFICATIVA

O *Pecari tajacu*, conhecido como cateto, possui uma população mundialmente estável, entretanto, devido a caça predatória e a destruição de seus habitats, nos biomas Caatinga e Mata Atlântica é considerado como vulneral à extinção. Esse fato, aliado a característica de boa adaptabilidade desses animais em cativeiros, permite a possibilidade da criação comercial, como forma de diminuir a caça predatória e gerar uma fonte alternativa de proteína e renda para a população, podendo ainda se tornar uma solução para o aproveitamento de áreas improdutivas de propriedades rurais.

Diante do exposto, estudos acerca da fisiologia reprodutiva precisam ser desenvolvidos, os quais são essenciais tanto para a conservação como para produção da espécie. Em especial, o desenvolvimento de testes que sejam realizados para avaliar as condições do sêmen fresco e criopreservado são importantes para predizer a capacidade de fecundante do mesmo, haja vista a pouca disponibilidade de fêmeas para realização de testes *in vivo*, por meio de inseminação artificial.

Contudo, os testes de fertilidade *in vitro* são de alto custo, além de necessitarem de uma grande quantidade e boa qualidade de gametas, tornando-se assim limitado para aplicação em algumas espécies domésticas e, principalmente, em silvestres ameaçadas ou não. Assim, o uso de teste com oócitos heterólogos e/ou a membrana perivitelina do ovo de galinha são substratos interessantes para atender essa necessidade, visando alternativas que predigam a qualidade do sêmen fresco e criopreservado sem perder a precisão e acurácia fecundação *in vitro*.

Esse conhecimento permitirá identificar um procedimento viável para predizer a capacidade fecundante de amostras de sêmen criopreservado, e consequentemente, o estabelecimento de protocolos eficazes de criopreservação, bem como a identificação do potencial reprodutivo dos machos. Tais informações permitirão a formação de bancos de germoplasma masculino, útil para a conservação da espécie, além de melhorar o aproveitamento desses reprodutores dentro do sistema produtivo.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Determinar a capacidade dos espermatozoides de catetos em promover interações com substratos heterólogos.

4.2. Objetivos Específicos

- a) Avaliar a capacidade de penetração *in vitro* dos espermatozoides de catetos em oócitos suínos recuperados de folículos antrais.
- b) Comparar a capacidade de ligação *in vitro* do espermatozoide à fresco e criopreservado de catetos, utilizando o teste de ligação à membrana perivitelina do ovo de galinha.
- c) Identificar relações entre os parâmetros espermáticos e os testes de interação *in vitro*, utilizando oócitos heterólogos e membrana perivitelina do ovo de galinha.

5. REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, N.I.; OHASHI, O.M.; GUIMARÃES, D.A.; PENDU, Y.L.; DIAS, H. Alternativas de sistemas de produção de caititu (*Tayassu tajacu*) para pequena agricultura na Amazônia. **Manaus: Embrapa Amazônia Oriental**. 2007.
- ALVES, H.M; OLIVEIRA, I.R.S; CASTELO, T.S; LIMA, G.L; SOUZA, A.L.P; MOREIRA, M.A.P; PAULA, V.V.; SILVA, A.R. Comparison of different glycerol and egg yolk concentrations added to tris-based extender for the collared peccaries (*Tayassu tajacu*) semen freezing. **Reprod. Domest. Anim.**, v.48, p.506-511, 2013.
- AMANN, R. P.; HAMMERSTEDT, R. H.; SHABANOWITZ, R. B. Exposure of human, boar, or bull sperm to a synthetic peptide increases to binding to an egg-membrane substrate. **J. Androl.**, v.20, n.1, p.34-41, 1999.
- AMORIM, E.A.M. **Alteração da membrana espermática de suínos, bovinos e equinos na qualidade do sêmen**. 2008. 174p. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG. 2008.
- ARRUDA, R.P Importância da qualidade do sêmen em programas de IATF e TETF. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada. **Anais...** Londrina, 2004, p.166-179.
- ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C. Validação de uma técnica para avaliação simultânea das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozoides bovinos. **Acta Sci. Vet.**, v. 31, p. 230-231, 2003.
- BARBATO, G.F.; CRAMER, P.G. & HAMMERSTEDT, R.H. A practical in vitro sperm-egg binding assay that detects subfertile males. **Biol. Reprod.**, v.58, p.686-699, 1998.
- BAUDI, D. L.; JEWGENOW, K.; PUKAZHENTHI, B. S.; SPERCOSKI, K. M.; SANTOS, A. S.; REGHELIN, A. L.; CÂNDIDO, M. V.; JAVOROUSKI, M. L.; MULLER, G.; MORAIS, R. N. Influence of cooling rate on the ability of frozen-thawed sperm to bind to heterologous zona pellucida, as assessed by competitive in vitro binding assays in the ocelot (*Leopardus pardalis*) and tigrina (*Leopardus tigrinus*). **Theriogenology**. v.69, p.204-211, 2008.
- BOUDREAU, M. D.; BELAND, F. A. Uma avaliação das propriedades biológicas e toxicológicas de *Aloe barbadensis* (Miller), *Aloe vera*". **Jornal da ciência ambiental e da saúde. Part C, Environmental carcinogenesis & ecotoxicologia**, v.24, p.103-54, 2006.
- BOUSSEAU, S.; BRILLARD, J.P.; MARQUANT-LE GUIENNE, B.; GUÉRIN, B.; CAMUS, B.; LECHAT, M. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. **Theriogenology**, v. 50, p. 699-706, 1998.

BRACKETT, B.G.; COFONE, M.A.; OICE.M.L; BOUSQUET, D. Use of zona-free hamster ova to asses sperm fertilizing ability of bull e stallion. **Gamete**. v.5, p.217-227, 1982.

CARDOSO, R.C.S.; SILVA, A.R; UCHOA, D.C.; SILVA, L.D.M. Cryopreservation of canine semen using a coconut water extender with egg yolk and three different glycerol concentrations. **Theriogenology**, v.59, p.743-751, 2003.

CASTELO, T.S.; BEZERRA, F.S.B.; SOUZA, A.L.P.; MOREIRA, M.A.P.; PAULA, V.V.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.R. Influence of the thawing rate on the cryopreservation of semen from collared peccaries (*Tayassu tajacu*) using Tris-based extenders. **Theriogenology**, v.74, p.1060-1065, 2010.

CENSYRA, J.C. Valoracion laboratorial de la calidad seminal. Correlacion com la fertilidad. In: Proceedings de las 7º Jornadas Internacionales de Reproducción Animal. **Anais...** Ponencias Y Comunicaciones, Múrcia, Espana, p 61-69, 1994.

CHOI, Y. H.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; SEIDEL JR.; SQUIRES, E. L. Effect of capacitation of stallion sperm with polyvinylalcohol or bovine serum albumin on penetration of bovine zona-free or partially zona-removed equine oocytes. **J.Anim. Sci.** v.81, p.2080-2087, 2003.

CODDE, J.M., BERGER, T. In vitro fertility of rams in relation to sperm-zona pellucida binding and sperm-zona pellucida penetration of ovine oocytes. **Theriogenology**, v. 44, p.901-906,1995.

COETZEE, K., KRUGE, T.F., LOMBARD, C.J. Predictive value of normal sperm morphology: a structured literature review. **Human. Reprod. Update.**, v.4, n.1, p.73-82. 1998.

COMIZZOLI, P.; MAUGET, R.; MERMILLO, D. P. Assessment of in vitro fertility of deer spermatozoa by heterologous IVF with zona-free bovine oocytes. **Theriogenology**, v.56, p.261–274, 2001.

CORCINI, C.D.; SILVA, B.E.; BRIZOLARA, R.M.R.; GHELLER, S.M.M.; VARELA JUNIOR, A.S.; BONGALHARDO, D.C.; 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.

CORCINI, C.D.; STEPHAN, M.H.; COLARES, E.P.; SANTOS, E.C.; VARELA, A.S. JR.; BONGALHARDO, D.C.; LUCIA, T. JR. In vitro assays for vesper mice (*Calomys laucha*) sperm using heterologous substrates from nonrodent species. **J. Exp. Zool.**, v.317, n.2, p.96-102, 2011.

CORCINI, C.D. **Estudo de testes in vitro para a predição de fertilidade de machos mamíferos, Pelotas, Brasil. 2010.** Tese (Doutorado), Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 2010

CORREA, J.R.; PACE, M.M.; ZAVOS, P.M. Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination program. **Theriogenology**, v. 48, p. 721-731, 1997.

COX, J.F.; ALFARO, V.; MONTENEGRO, V.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. **Theriogenology**, v.66, p. 860-867, 2006.

COX, J.F.; ÁVILA, J.; SARAIVA, F.; SANTA MARIA, A. Assessment of fertilizing ability of goat spermatozoa by in vitro fertilization of cattle and sheep intact oocytes. **Theriogenology**, v.41, p.1621-1629, 1994.

CSERMAK, JR. A.C. **Uso de sondas fluorescentes e do ensaio de ligação do espermatozoide do cão (*Canis lupus familiaris*) à membrana perivitelina de ovo de galinha (*Gallus gallus*) como método para predição da capacidade fertilizante do sêmen, Viçosa, Brasil. 2011.** Tese (Doutorado), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2011

DERIVAUX, J. Reprodução dos animais domésticos. **Zaragoza: Ed. Acribia**, 446, 1980.

DOTT, H.M.; FOSTER, G.C. A technique for studying the morphology of mammalian spermatozoa which are eosinophilic in a different “live/dead” stain. **J. Reprod. Fertil.**, v.29, p.443-445, 1972.

GADEA, J.; MATAS, C.; LUCAS, X. Prediction of porcine semen fertility by homologous in vitro penetration (hIVP) assay. **Anim. Reprod. Sci.**, v.56, p.95-108, 1998.

GARAY, R. de M. **Uso de sondas fluorescentes para avaliação seminal de ejaculados de gato do mato pequeno (*Leopardus tigrinus*) e ensaio de ligação à membrana perivitelina de ovo de galinha (*Gallus gallus*) como ferramenta de predição de fertilidade espermática, Viçosa, Brasil, 2012.** Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2012

GARNER, D.L.; THOMAS, C.A.; JOERG, H.W.; DEJANETTE, J.M.; MARSHALL, C.E. Fluorometric assessment of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biol. Reprod.**, v. 57, p. 1401-1406, 1997.

HANADA, A.; CHANG, MC. Penetration of zona-free eggs by spermatozoa of different species. **Biol. Reprod.**, v.6, p.300–9, 1972

HAY, M.A., KING, W.A., GARTTLEY, C.J., LEIBO, S.P., GOODROWE, K.L. Canine spermatozoa-cryopreservation and evaluation of gamete interaction. **Theriogenology**, v.48, p.1329-1342, 1997.

HELLGREEN, E.C.; LOCHMILLER, M.S.; AMOSS, J.R.; GRANT, W.E. Seasonal variation in serum testosterone, testicular measurement and sêmen characteristics in the collared peccary (*Tayassu Tajacu*). **J. Reprod. Fertil.**, v.85, p.677– 86, 1989.

HEWIT, D.A.; ENGLAND, G.C.W. The canine oocyte penetration assay; its use as an indicator of dog spermatozoal performance in vitro. **Anim. Reprod. Sci.**, v.50, p.123-139, 1997.

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). **Operação Bixo aberta o cerco contra a caça ilegal**. Disponível em <www.icmbio.org.br> Acesso em: 22 de novembro de 2014.

IUCN, IUCN Red List of Threatened Species, Version 2013. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 18 February 2014.

JEYEDRAN, R.S.; VAN DER VEN H.H.; ZANEVELD, L.J.D. The hypoosmotic swelling test: An update. **Arch Androl**, v.29, p.105-116, 1992.

JEYENDRAN RS; VAN DER VEN, H.H.; PERZ-PALAEZ M.; CRABO, B.G.; ZANEVELD, L.J.D. Development of an assay to asses the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **J. Reprod. Fertil.**, v.70, p.219-225, 1984.

JOHNSTON, S.D.; KUSTRITZ, M.V.R.; OLSON, P.N.S. Canine and feline. **Theriogenology**. W.B.Saunders (Philadelphia). 2001.

KJAESTAD, H., ROPSTAD, E., ANDERSEN BERG, K. Evaluation of spermatological parameters used to predict the fertility of frozen bull semen. **Acta Vet. Scand.**, v.34, p.299-303, 1993.

KOUBA, A.J.; ATKINSON, M.W.; GANDOLF, A.R.; ROTH, T. Species-specific spermegg interaction affects the utility of heterologous bovine in vitro fertilization system for evaluating antelope sperm. **Biol. Reprod.**, v.65 p.1246-1251, 2001.

LAGO, A.E.A; NASCIMENTO, H.H.L; SOUZA, A.L.P; BEZERRA, J.A.B; SILVA, A.M; CASTELO, T.S; SILVA, A.R. Aloe Vera use on short-term preservation of Collared Pecari (*Pecari tajacu*) semen. **V International symposium on Animal Biology of Reproduction**, October, 8-11, ISABR 2014.

LANDIM-ALVARENGA, F.C., ALVARENGA, M.A., SEIDEL, G.E., SQUIRES, E.L., GRAHAM, J.K. Penetration of zona-free hamster, bovine and equine oocytes by stallion and bull spermatozoa pretreated with equine follicular fluid, dilauroylphosphatidylcholine or calcium ionophore A23187. **Theriogenology**, v.56, p. 937-953, 2001.

LIU, D.Y., BAKER, H.W.G. Evaluation and assessment of semen for IVF/ICSI. **Asian J. Androl.**, v.4, p.281-285, 2002.

LOSANO, JD1; ANGRIMANI, DS; PEREIRA, RJ; ROCHA, AM; CRISCUOLO, TS; BARNABE, VH; BARNABE, RC; MENDES, CM; ASSUMPÇÃO, ME; NICHI, M. Utilisation of sperm-binding assay combined with computer-assisted sperm analysis to evaluate frozen-thawed bull semen. **Andrology**, v.47, p.77-84, 2015.

- LUZ, S.L.N.; NEVES, J.P.; GONÇALVS, P.B.D. Parâmetros utilizados na avaliação do sêmen congelado ovino para inseminação laparoscópica. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.3, p.10-18, 2000.
- MACEDO, JR. M.C.; DESCHAMPS, J.C.; LUCIA, JR. T.; BORDIGNON, J.; SERRET, C.; 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.
- MAIA, K.M.; PEIXOTO, G.C.X.; CAMPOS, L.B.; SILVA, A.M.; CASTELO, T.S.; RICARTE, A.R.F.; SILVA, A.R. Estrous synchronization in captive collared peccaries (*Pecari tajacu*) using a prostaglandin F2 α analog. **Zoo. Sci.**, v.34, n.11, p.1115-1120, 2014.
- MARTÍNEZ, E.; VÁZQUEZ, J. M.; MATAS, C.; ROCA, J.; COY, P.; GADEA, J. Evaluation of boar spermatozoa penetrating capacity using pig oocytes at the germinal vesicle stage. **Theriogenology**, v.40, p.547-557. 1993.
- MATSUOKA, T.; IMAI, H.; KOHNO, H.; FUKUI, Y. Effects of bovine serum albumine and trehalose in semen diluents for improvement of frozen-thawed ram semen. **J. Reprod. Devel.**, v.52, n.5, p.675-683, 2006.
- MCHUGH, J. A.; RUTTLEDGE, J. J. Heterologous fertilization to characterize spermatozoa of the genus Bos. **Theriogenology**, v.50, p. 185-193, 1998.
- MORTIMER, S.T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. **Hum. Reprod. Update**, v. 3, n. 5, p. 403-439, 1997.
- MUGNIER, S.; AQUILA, M.E.D., PEALEZ, J.; DOUET, C.; AMBROUSI, B.; SANTIS, T.D.; LACALANDRA, G.M.; LEBOS, C.; SIZARET, P.Y., DELALEU, B.; MONGET, P.; MERMLLOD, P.; MEYERS, S.A., 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.
- NOGUEIRA, S.S.C.; NOGUEIRA-FILHO, S.L.G. Wildlife farming: an alternative to unsustainable hunting and deforestation in Neotropical forests. **Biodivers. Conserv.**, v.20, p.1385–1397, 2011.
- NOTHLING, J.O.; GERSTENBERG, C.; VOLKMANN, D.H. Success with intravaginal insemination of frozenthawed dog semen – a retrospective study. **J. S. Afr. Vet. Assoc.**, v.66, p.49-55, 1995.
- OETTLÉ, E. E. Sperm mophology and fertility in the dog. **J. Reprod. Fertil.**, v. 47, p.257-60, 1993.
- PAIVA, A.L.C.; NUNES, T.L.; OLIVEIRA, M.G.C.; MORAIS, A.M.L.; SANTOS, E.A.S.; SILVA, A.R.; OLIVEIRA, M.F.; PAULA, V.V. Effects of atipamezole and medetomidine administration on seminal variables and functions of erection and ejaculation of the collared peccary (*Tayassu tajacu*) after electroejaculation. **BMC Vet. Res.**, v.10, p.170, 2014.

PAPA, F.O.; GABALDI, S.H.; WOLF, A. Viabilidade espermática pós-descongelação de sêmen bovino criopreservados com meio diluente glicina-gema em quatro diferentes tempos de estabilização. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.24, p.39-44, 2000.

PAPADOPOULOS, S.; HANRAHAN, J.P.; DONOVAN, A.; DUFFY, P.; BOLAND M.P.; LONERGAN, P. In vitro fertilization as a predictor of fertility from cervical insemination in sheep. **Theriogenology**, v.63, p.150-159, 2005.

PELAEZ, J.; BREININGER, E.; ALEGRE, B.; PEÑA, F.J.; DOMÍNGUEZ, J.C. *In vitro* evaluation of the quality and fertilizing capacity of boar sêmen frozen in 0.25 ml straws. **Reprod. Domest. Anim.**, v. 41, pp. 153-161, 2006.

PEÑA, A.; LINDE-FORSBERG, C. Effects of spermatozoa concentration and post-thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa. **Theriogenology**, v.54, p.703-718, 2000.

PESH, S.; BERGMANN, M. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. **Micron.**, v.37, n.7, p.597-612. 2006.

PÉREZ-GARNELO, S.S.; OBTER, M.; BORQUE, C.; TALAVERA, C.; DELCLAUX, M.; Martinez-Nevado, E.; PALASZ, A.T.; DE LA FUENTE J. Post-thaw viability of european bison (*Bison Bonasus*) sêmen frozen with extenders containing egg yolk orlipids of plant origin and examined with a heterologous in vitro fertilization assay. **J. Zoo. Wildl. Med.**, v.37, n.2, p.116-125, 2006.

PÉREZ-LLANO, B.; LORENZO, J.L.; YENES, P.; TREJO, A.; GARCÍA-CASADO, P. A short hypoosmotic swelling test for the prediction of boar sperm fertility. **Theriogenology**, v.56, p.387-398, 2001.

PEIXOTO, G.C.X; SILVA, M.A; CASTELO, T.S; SILVA, A.M; BEZERRA, J.A.B; SOUZA, A.L.P; OLIVEIRA, M.F. SILVA, A.R. Individual variation related to testicular biometry and sêmen characteristics in collared peccaries (*Tayassu Tajacu* Linnaeus, 1758). **Anim. Reprod. Sci.**, v.134, p.191– 196, 2012.

ROBERTSON, L.; BROWN, H.L., STAINES, H.J.; WISHART, G.J. 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.

RODRIGUES, B.A. **Efeito do diluidor à base de albumina sérica bovina (BSA) sobre a viabilidade in vitro do sêmen canino criopreservado, Rio Grande do Sul, Brasil, 1997.** Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rio Grande do Sul. 1997.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Methods for sperm evaluation and their relationship to fertility. **In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**, Goiânia. Anais.2005.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v.62, p.77-111, 2000.

SAMPAIO NETO, J.C.; SALGUEIRO, C.C.M.; MATEOS-REX, E.; NUNES, J.F. Utilização do diluente ACP-105® na refrigeração do sêmen equino. **Vet. Bras. Reprod. Anim.**, v.5, p.137-139, 2002.

SANCHEZ-PARTIDA, L.G., WINDSOR, D.P., EPPLESTON, J., SETCHELL, B.P., MAXWELL, W.M. Fertility and its relationship to motility characteristics of spermatozoa in ewes after cervical, transcervical, and intrauterine insemination with frozen-thawed ram semen. **J. Androl.**, v.20, p.280-288, 1999.

SANTOS, E.A.A.; SOUSA, P.C.; PEIXOTO, G.C.X.; SIMÃO, B.R.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.R. Establishing the hypoosmotic swelling test for sperm analysis in collared peccaries (*Pecari tajacu*). **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.65, p.1257-1260, 2013.

SANTOS, M.C.da R. **Métodos alternativos para análises da capacidade de ligação dos espermatozoides caprinos, Viçosa, Brasil, 2010.** Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Viçosa. 2010.

SANTOS, T. C. Morfologia dos ovários, tubas uterinas e útero em catetos (*Tayassu tajacu*, Linnaeus, 1758) e queixadas (*Tayassu pecari*, Link, 1795). **Vet. Res. Anim. Sci.**, v.37, n.3, p.00-00. 2000.

SILVA, A.R.; CASTELO, T.S.; LIMA, G.L.; PEIXOTO, G.C.X. Conservation of germplasm from wild animals of the Caatinga biome. **Acta Sci. Vet.**, v.38, p.373-389, 2010.

SILVA, A.R.; SOUZA, A.L.P.; SANTOS, E.A.A.; LIMA, G.L.; PEIXOTO, G.C.X.; SOUZA, P.C.; CASTELO, T.S. Formação de bancos de germoplasma e sua contribuição para a conservação de espécies silvestres no Brasil. **Ciênc. Anim.**, v.22, 2012.

SILVA, M.A.; PEIXOTO, G.C.X.; LIMA, G.L.; BEZERRA, J.A.B.; CAMPOS, L.B.; PAIVA, A.L.C.; PAULA, V.V.; SILVA, A.R. Cryopreservation of collared peccaries (*Tayassu tajacu*) semen using a powdered coconut water (ACP-116c) based extender plus various concentrations of egg yolk and glycerol. **Theriogenology**, v.78, p.605-611, 2012.

SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; UCHOA, D.C.; SILVA, L.D.M. Quality of canine semen submitted to single or fractionated glycerol addition during the freezing process. **Theriogenology**, v.59, p.821-829, 2003.

SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; SILVA, L.D.M.; CHIRINÉA, V.H.; LOPES, M.D.; SOUZA, F.F. Prognostic value of canine frozen-thawed semen parameters on in vitro sperm-oocyte interactions. **Theriogenology**, v.66, p.456-62, 2006.

SIQUEIRA, J.B.; GUIMARÃES, J.D.; COSTA, E.P.; HENRY, M.; TORRES, C.A.A.; SILVA, M.V.G.B.; SILVEIRA, T.S. Relação da taxa de gestação com sêmen bovino congelado e testes de avaliação espermática in vitro. **Ver. Bras. Zootec.**, v.36, n.2, p.387-395, 2007.

SODERQUIST, L.; JANSSON, L.; LARSSON, K. et al. Sperm morphology and fertility in al bulls. *J. Vet. Med. Ser A – Physiology Pathology Clinical Medic*, v. 38, p. 534-543, 1991.

SOUZA, A.L.P.; LIMA, G.L.; PEIXOTO, G.C.X.; BEZERRA, J.A.B.; SILVA, A.M.; OLIVEIRA, M.F.; A.R. SILVA. Innovative use of *Aloe vera* as a cryoprotectant for the collared peccaries (*Pecari tajacu*) semen freezing. **V International Symposium on Animal Biology of Reproduction**, October, Campinas, SP, p.8-11, 2014.

SOUZA, P.C; SANTOS, E.A.A; SOUZA, A.L.P; LIMA, G.L; BARROS, F.F.P.C; OLIVEIRA, M.F; SILVA, A.R. Sperm morphological and morphometric evaluation in captive collared peccaries (*Pecari tajacu*). **Pesq. Vet. Bras.**, v.33, n.7, p. 924-930. 2013.

SOUZA, A.L.P.; CASTELO, T.S.; QUEIROZ, J.P.A.F.; BARROS, I.O.; PAULA, V.V. Evaluation of anesthetic protocol for the collection of semen from captive collared peccaries (*Tayassu tajacu*) by eletroejaculation. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 116, p.370–375, 2009.

SOWLS, L. K. 1997. Javelinas and other peccaries: their biology, management, and use. Texas A e M University Press. **College Station**. ed. 325 pp.

STROM HOLST, B.; LARSSON, B.; RODRIGUEZMARTINEZ, H.; LAGERSTEDT, A. S.; LINDEFORSBERG, C. Prediction of the oocyte recovery rate in the bitch. **J. Vet. Med.**, v.48, p.587–592, 2001.

SUAREZ, S.S.; PACEY, A.A. Sperm transport in the female reproduction tract. **Hum. Reprod. Update**, v. 12, p. 1-2, 2006.

TABERNER, E.; MORATÓ, R.; MOGAS, T.; MIRÓ, J. Ability of Catalanian donkey sperm to penetrate zona pellucida-free bovine oocytes matured in vitro. **Anim. Reprod. Sci.**, 2009.

TARDIF, S.; LAFOREST, J.P.; CORMIER, N.; BAILEY, J.L. The importance of porcine sperm parameters on fertility in vivo. **Theriogenology**, v. 52, p. 447-459, 1999.

TARTAGLIONE, C.M.; RITTA, M.N. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v.62, p.1245-1252, 2004.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v.57 p.149-179, 2002.

WABERSKI, D., MAGNUS, F., FERREIRA, F.M., PETRUNKINA, A.M., WEITZE, K.F., TOPFER-PETERSON, E. Importance of sperm-binding assays for fertility prognosis of porcine spermatozoa. **Theriogenology**, v.63, p. 470-484, 2005.

WALTERS, A.H.; EYESTONE, W.E.; SAACKE, R.G.; PEARSON, R.E.; GWAZDAUSKAS, F.C. Sperm morphology and preparation method affect bovine embryonic development. **J. Androl.**, v.25, n.4, p.554-563, 2004.

WILDT, D.E.; PUKAZHENTHI, B.; BROWN, J.; MONFORT, S.; HOWARD, J.; ROTH, T. Spermatology for understanding managing and conserving rare species. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.7, p.811-824, 1995.

YANAGIMACHI, R.; YANAGIMACHI, H.; ROGERS, B.J. The use of zona-free animal ova as a test-system for the assessment of the fertilizing capacity of, human spermatozoa. **Biol. Reprod.**, v.15, p.471–6, 1976.

ZAMBELLI, D., CUNTO, M. Semen collection in cats: Techniques and analysis. Review. **Theriogenology**, v. 66, p. 159–165, 2006.

ZHAO, X.M.; SONG, X.X.; KAWAI, Y.; NIWA, K. Penetration in vitro of zona-free pig oocytes by homologous and heterologous spermatozoa. **Theriogenology**, v.58, p.995-1006, 2002.

CAPÍTULO 1 - ESTIMATING THE FERTILIZING ABILITY OF COLLARED PECCARIES (*Pecari tajacu*) SPERM BY ANALYSING ITS INTERACTION WITH SWINE OOCYTES

LB Campos¹, AM da Silva¹, KM Maia, TL Nunes², VV Paula², MF Oliveira³, AR Silva^{*1}

¹Laboratory of Animal Germplasm Conservation (LCGA), Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró, RN, Brazil;

²Laboratory of Veterinary Surgical Technique and Anesthesiology, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró, RN, Brazil

³ Laboratory of Animal Morphophysiology, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró, RN, Brazil

* Corresponding author: Laboratory of Animal Germplasm Conservation (LCGA), Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró, RN, Brazil.

Tel.: +55 84 3317 8374

E-mail address: legio2000@yahoo.com (A.R. Silva).

Artigo nas normas da Revista Reproduction in Domestic Animals

Contents: The aim of the present study was to evaluate the binding capacity of collared peccarie fresh sperm by using the heterologous *in vitro* interaction test with swine oocytes, and establish the relations among sperm parameters with the binding test. Ejaculates from eleven adult males were collected by electroejaculation and evaluated for motility, vigor, viability, normal morphology, membrane integrity and kinetic motility parameters by CASA. In addition, samples were analyzed by the *in vitro* interaction test with swine oocytes, which was conducted under a humidified atmosphere containing 5% CO₂ for 18 h at 38.5 °C. The results were expressed as mean $\pm$ sd and a simple linear regression model was used to identify associations between sperm–oocyte interactions (dependent variables) and sperm parameters (independent variables). Thus, it was found that in all oocytes there interactions with the presence of spermatozoa have interacting rate was 100%, the mean of number bound spermatozoa 39.4 ± 4.6 , bound spermatozoa/oocyte 39.4 ± 4.6 and penetrated spermatozoa/oocyte 2.46 ± 0.7 . Verified a significant association between the number of bound sperm and straightness (STR) ($R^2=61.7\%$; $P=0.04$). In conclusion, the *in vitro* interaction test using the swine oocytes represents indicatives of collared peccary sperm *in vitro* penetration. Thus, it is suggested that this *in vitro* interaction test using heterologous oocytes can be used as an indicator for the functional evaluation of the fertilizing capacity of collared peccary sperm, demonstrating its application in the selection of different reproductive.

Keywords:wildlife, semen, *in vitro* penetration test.

Introduction

Among Neotropical wild mammals, the collared peccary, *Pecari tajacu*, has been the target of special attention from the scientific community during the last decade (Nogueira and Nogueira-Filho, 2011). This species, currently classified as stable populations (IUCN, 2014), easily adapts to and reproduces in captivity (Mayor et al., 2007), being alternative protein and economic source for local communities. This way, the captive breeding could reduce the hunting pressure on wild populations (Abbott and Van Kooten, 2011), and contribute to obtain valuable information for proper reproductive management practices. Besides, assist in the selection of individuals best use of these animals with a view to increase in productivity and efficiency, and for genetic improvement (Guimarães et al., 2013).

It is necessary to be aware of the reproductive aspects of the collared peccaries when aiming for its multiplication under captivity. Until this moment, semen assessment in such species has been mainly based on the evaluation of classic parameters (Santos et al., 2013; Sousa et al., 2013; Silva et al., 2014). In addition, evaluations of semen have included of the computer-aided semen analysis (CASA) (Castelo et al., 2010; Souza et al., 2014). These parameters have been routinely used to predict potential fertilizing capacity of sperm; however some of these have been inconsistent indicators of male fertility in animals (Januskausk et al., 2000; Tartaglione and Ritta, 2004).

To overcome such limitations, the capacity of spermatozoa to penetrate homologous oocytes *in vitro* can be used to estimate fertility (Zhao et al., 2002; Macedo et al., 2006). However, it is often difficult to obtain oocytes of the same species, especially when dealing with wild or endangered ones. Therefore, heterologous oocyte binding assays have been developed, as an alternative is employing oocytes of laboratory animals, as hamster, since its oocytes can be penetrated by sperm of other species (Hanada & Chang, 1972; Yanagimachi et al., 1976; Bousquet & Brackett, 1982; Berger et al., 1989) or structures of domestic species obtained at slaughterhouses (Comizzoli et al., 2001). Furthermore, compared to artificial insemination, heterologous oocyte binding assays requires fewer cells. Therefore, sperm function can be thoroughly tested while sparing valuable gametes (Andrew et al., 2001).

The efficiency of the *in vitro* interaction test using heterologous oocytes has been described in human (Canovas et al., 2007), and the domestic swine (Sinowatz et al., 2003), which is the domestic species more closely related to the collared peccaries (Cavalcante-Filho et al., 1998). Thus, combining semen analysis with the results of oocyte penetration assays should provide a reliable method to assess the fertilizing ability of semen samples (Hewit & England, 1997).

Therefore, the aim of this study was to evaluate the prognostic value of fresh semen measurements, e.g. sperm motility patterns and sperm populations identified by CASA assay, plasma membrane integrity, and sperm morphology, on the *in vitro* interaction between collared peccaries sperm and swine oocytes.

Materials and methods

Chemicals, reagents and media

Unless indicated otherwise, all chemicals, reagents and media were from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

Ethics and animals

Animal use and care were approved by the Animal Ethics Committee of the Federal Rural University of Semi-Arid (CEUA/UFERSA, n° 23091.004271/2014-71). A total of eleven sexually mature male collared peccaries were used. The animals belonged to the Centre of Multiplication of Wild Animals (CEMAS/UFERSA), located in the northeast of Brazil (Mossoro, RN, Brazil; 5°10'S, 37°10'W). The climate in this region is typical semiarid, with an average annual temperature of 27°C. The animals were isolated from the females 3 months before the outset of the study. They were maintained outdoors under a 12 h natural photoperiod, in groups of five in paddocks (20 m x 3 m) with a covered area of (3 m x 3 m). They were fed on a diet consisting of corn (79.8%), soybean meal (15.4%), wheat bran (1.45%), calcium (2.6%), vitamin (0.2%) and mineral (0.05%) premix, supplemented with tropical fruits. Water was provided *ad libitum*.

Semen collection and initial evaluation

The semen collection was performed in the period from September to October. Initially, males were physically restrained using a hand net and then anesthetized using intravenous administration of propofol (Propovan, Cristalia, Itapera, Brazil), given as a bolus (5 mg/kg). Semen collection was performed using an electroejaculator (Autojac, Neovet, Uberaba, Brazil) connected to a 12 V source (Castelo et al., 2010). The volume of the samples was measured by micropipettes. Sperm motility and vigor (0–5; zero characterized by no movement and five characterized by progressive forward movement) were assessed immediately by evaluating a sample (5 μ L) using light microscopy at 100x and 400x magnification, respectively. Bengal Rose stained smears were prepared with 5 μ L of semen for evaluating the sperm morphology and acrosomal integrity using light microscopy (100x), counting 200 cells per slide (Sousa et al., 2013). The percentage of live spermatozoa was established by analysing a slide stained with brome-phenol blue under light microscopy (40x), counting 200 cells per slide.

Following initial assessment, 10 μ L of semen aliquot was diluted in 2 mL of 10% buffered formalin, and the sperm concentration was determined using a Neubauer counting chamber (Silva et al., 2014). Functional integrity of the sperm membrane was evaluated by a hypo-osmotic swelling test, using distilled water (0 mOsm/L) as the hypo-osmotic solution. Briefly, an aliquot (5 μ L) of semen was diluted in 45 μ L hypo-osmotic solution and kept in a water bath at 37°C. After 45 min, the aliquot of semen was placed on a glass slide, covered by a coverslip and evaluated by phase-contrast microscopy (40x), counting 200 cells. Sperm with swollen coiled tails indicated a functional plasma membrane (Santos et al., 2013).

Plasma membrane integrity was assessed with a fluorescent solution containing the fluorophores 6-carboxy-fluorescein diacetate (C-FDA) and propidium iodide (PI). An aliquot (5 μ L) of thawed semen was extended in 20 μ L fluorescent solution. After 10 min,

slides of the stained samples were evaluated by epifluorescence microscopy (LEICA, Episcopic Fluorescent Attachment EFA Halogen Lamp Set, Leica Microsystems Inc., Bannockburn, USA). For each sample stained with C-FDA/PI, 200 sperm were counted and classified as having or lacking an intact plasmalemma, according to the color; sperm stained green (C-FDA) were considered to have an intact plasmalemma, whereas those stained red (PI) or partially stained red, were considered non-intact (Souza et al., 2014).

The sperm motility kinetic parameters were assessed by a Computer Assisted Semen Analysis – CASA (IVOS 12.0, Hamilton-Thorne, Beverly, USA). The following parameters were analyzed: the number of counted cells; the percentage of total motile sperm; the percentage of progressive motile sperm; velocity average pathway – VAP (mm/s); the velocity straight line – VSL (mm/s); the curvilinear velocity – VCL (mm/s); the amplitude lateral head – ALH (mm); the beat cross frequency – BCF (Hertz); the straightness – STR (%); and the linearity – LIN (%). According to low VAP cut-off (LVV) and medium VAP cut-off (MVV), the overall sperm population was subdivided in four categories: rapid, with $VAP > MVV$; medium, with $(LVV < VAP < MVV)$; slow, with $VAP < LVV$; and static, the proportion of cells that were not moving (Verstegen et al., 2002).

***In vitro* interaction test**

Oocyte recovery and selection

Ovaries from gilts were transported within 10 min from a slaughterhouse to the laboratory in saline plus penicillin (0.05 mg/mL) at 35-38°C. Upon arrival, ovaries were washed thoroughly in prewarmed saline solution and kept at 4-8°C during 17 h for oocyte harvesting only to be performed at the time of semen collection. After this period, follicles (2-8 mm) were aspirated using needle 21G attached to a 10 mL syringe. The aspirated

content was placed into 15 mL tubes and the sedimented portion was deposited into Petri dish containing Dulbecco phosphate-buffered saline (DPBS) supplemented with 0.4% bovine serum albumin (BSA) and gentamicina sulfate (40 µg/mL).

Retrieved immature swine *cumulus*-oocyte complexes (COCs) were classified based on cellular vestments and cytoplasmic uniformity (Bertoldo et al., 2010). Only GI to GIII COCs were subjected to *in vitro*-interaction test. Oocytes with multiple partitions or lesions in the zona pellucida were not selected. Following oocyte selection, *cumulus* cells were removed by successive pipetting, and denuded immature oocytes were used.

Sperm–oocyte co-incubation

The selected oocytes were transferred to 100 µL droplets (10 structures/droplet) of incubation medium (114 mM NaCl; 3.1 mM KCl; 0.4 mM NaH₂PO₄; 10 mM calcium lactate; 25 mM NaHCO₃; 10 µg/mL phenol red; 1.4 mM caffeine; 2.0 mM CaCl₂·2H₂O; 0.5 mM MgCl₂; 10 mM Hepes; 6 mg/mL BSA; 0.45 mM sodium pyruvate; 5.5 mM glucose and 40 µg/mL gentamicina sulfate), pH 7.4-7.8, adapted by Macedo et al., 2006.

After sperm evaluation, sperm samples were washed by extending them in incubation medium described above (1:1) and centrifuged (700xg for 10 min) at room temperature. After washing, the supernatant was discarded and the concentration of sperm pellet was adjusted dilution in incubation medium, the sperm cell suspension was added to the oocytes in each droplet of medium to achieve a final volume of 100 µL, with a concentration of 1×10^6 motile sperm/mL. A minimum of 20 oocytes (two droplets) was used per replicate.

After incubation for 18 h at 38.5°C under a humidified atmosphere containing 5% CO₂ and 95% air, the oocytes were removed, washed in DPBS plus BSA, and transferred droplet of PBS associated paraformaldehyde during 30 min, after lavagens with PBS plus

0.4% BSA. Finally, oocytes were incubated for 10 min in Hoechst 33358 (10 µg/mL) to stain bound and penetrated sperm heads. Stained oocytes were placed on a clean slide with glycerol. These oocytes were examined at 40x under fluorescent illumination (LEICA, Episcopic Fluorescent Attachment EFA Halogen Lamp Set; Leica Microsystems Inc., USA) to identify the percentage of oocytes bound to sperm; structures with sperm penetrated into the perivitelline space or ooplasm, and the number of sperm that had bound and penetrated the oocytes.

Data analyses

The results were expressed as means ($\pm$ S.D.) and analyzed by Statview 5.0 software (SAS Institute Inc., Cary, USA). A simple linear regression model was used to identify associations between sperm–oocyte interactions (dependent variables) and sperm parameters (independent variables). From the data of *in vitro* interactions, the percentage of oocytes interacting with sperm was calculated; representing the total percentage of all forms of interaction between oocytes and sperm, as only bound, only penetrated, or bound plus penetrated oocytes. Similarly, the number of sperm interacting with oocytes was also calculated, i.e. the number of sperm only bound, only penetrated, or bound plus penetrated (interacted). Probabilities < 0.05 were considered significant.

Results

The mean values ($\pm$ S.D.) for fresh semen parameters evaluated by conventional and computerized (CASA) analysis from adult collared peccary are shown in at Table 1 and 2, respectively.

Table 1. Mean values ($\pm$ S.D.) for fresh semen characteristics collected from adult *Pecari tajacu* by electroejaculation (n = 11 ejaculates).

Parameters	Fresh
Sperm motility (%)	97.9 $\pm$ 3.34
Vigor (0–5)	5.0 $\pm$ 0.0
Viable sperm (%)	85.7 $\pm$ 9.9
HOST (%)	80.7 $\pm$ 6.4
Concentration (10^6 spzts/ml)	245.0 $\pm$ 115.48
Functional membrane integrity (%)	79.7 $\pm$ 1.4
Normal sperm morphology (%)	79.5 $\pm$ 8.68

Table 2. Sperm motility patterns observed in collared peccary fresh semen (n = 11) by computer aided semen analysis (CASA)

Sperm motility patterns	Mean $\pm$ S.D.
Total motile sperm (%)	83.4 $\pm$ 13.4
Progressively motile (%)	53.1 $\pm$ 26.9
Velocity average pathway (VAP)	54.3 $\pm$ 17.2
Velocity straight line (VSL) ($\mu\text{m/s}$)	39.8 $\pm$ 12.3
Velocity curvilinear (VCL) ($\mu\text{m/s}$)	110.0 $\pm$ 25.6
Amplitude lateral head (ALH) (μm)	5.7 $\pm$ 1.1
Beat cross frequency (BCF) (Hz)	38.4 $\pm$ 5.2
Straightness (STR) (%)	68.9 $\pm$ 4.9
Linearity (LIN) (%)	36.7 $\pm$ 4.9
Sperm subpopulations	
Rapid (%)	65.6 $\pm$ 31.8
Medium (%)	18.0 $\pm$ 19.1
Slow (%)	3.7 $\pm$ 2.8
Static (%)	12.8 $\pm$ 10.6

After eleven replications, a total of 118 ovaries resulted in 881 structures, obtaining an average of 7.5 oocytes/ovary. From these oocytes, 35 (4.0%), 117 (13.3%), 577 (65.5%) and 152 (17.2%) were classified as GI, GII, GIII and GIV, respectively, according to morphological criteria. Only GI to GIII oocytes were selected, resulting in 729 COCs (82.7%) used in this trial.

Results of sperm–oocyte interactions are expressed in Table 3. We only verified a significant association between the number of bound sperm and STR ($R^2=61.7\%$; $P=0.04$).

Table 03. Interactions among fresh collared peccary sperm (n = 11 samples) and heterologous oocytes after 18 h of incubation.

Sperm–oocyte interactions	Mean $\pm$ S.D.
Oocytes bound to spermatozoa (%)	100.0 $\pm$ 0.0
Oocytes penetrated by spermatozoa (%)	19.85 $\pm$ 5.5
Oocytes interacted with spermatozoa (%)	100.0 $\pm$ 0.0
No. bound sperm / oocyte	39.4 $\pm$ 4.6
No. penetrated sperm / oocyte	2.46 $\pm$ 0.7
No. interacted sperm / oocyte	40.99 $\pm$ 4.4

Discussion

The fertilization process consists in a complex event with multiple steps that directly influence the result. Briefly, embryo production by *in vitro* fertilization include since the immature oocyte recovery, *in vitro* oocyte maturation, sperm-oocyte co-incubation and development until the morula and blastocyst stage when the embryos are able to be transferred or cryopreserved. The technical efficiency can be achieved by the fertilizing capacity of the semen used. Thus, the predict fertility can be determined by association of different assays, resulting the prognostic values that when compared with real *in vivo* fertility rates can be considered a good predictor (Rodríguez-Martínez, 2013).

The choosing for using heterologous oocytes for the present assay was mainly due to the difficulty in obtaining peccaries oocytes. Thus, as being a species phylogenetically closer to swine, the oocytes of this domestic species were chosen. In addition, the pig has been routinely slaughtered in local abattoirs, becoming a source of oocytes available and inexpensive. The present study is the first to evaluate peccaries sperm's ability to bind pig oocytes.

The sperm-oocyte interacting rate was 100%, e.g., we found sperm bound and/or penetrated in all the oocytes used in the study. This is a result higher than those previously

described by Martinez et al. (1993) using swine sperm and homologous oocytes (88.8%). However, the fertilizing media used for the study were different in composition. The medium of present study had the presence of NaCl, KCl, NaH₂PO₄, NaHCO₃, Phenol red, CaCl₂·2H₂O, MgCl₂, Hepes different that work, possibly which could result in different sperm capacitation rates thus reflecting varied sperm-oocyte interacting rates.

In addition, the average number of peccary sperm (2.46 ± 0.7) that penetrate swine oocytes is similar to that found for swine sperm penetrating homologous oocytes (2.23 ± 0.30) as described by Campos et al. (2001). Considering that physiologically only one sperm should penetrate the oocyte, but in conditions *in vitro* were found more than two sperm in the oocytes this indicates.

The protocol used in this experiment was described by Macedo et al.,(2010) in which conducted studies in pigs, succeeding. Given the interaction of test results obtained in this study, suggests that this protocol can also be applied also in collared peccary

Thus, considering the observed sperm–oocyte interactions rate, oocytes from slaughtered swine females are useful heterologous substrates for *in vitro* penetration studies in collared peccary sperm. The penetration of *Pecari tajacu* sperm into swine oocytes represents a novel finding. These data suggest that the support zone pellucida pig sperm heterologous bond, for that the composition and structure of the zona pellucida is a key element. In fact, the zona pellucida of the pig has three glycoproteins (ZPA / ZP2, ZPB / ZP3 and ZPC / ZP3), similar to the composition of the zona pellucida of bovine, dog, cat (Goudet et al., 2008; Noguchi, 1994), possibly also resembles collared peccary. In fact, it were previously described the use of swine oocytes as a model for sperm boundering from *Calomys laucha* (Corcini et al., 2011), human (Canovas et al., 2007) and equine (Mugnier et al., 2009).

The majority of oocytes collected and used in this study belonged to GIII. The aspiration method used at present work yielded a higher number of GIII structures/ovary when compared to the study of Hoque et al. (2011) (1.85 ± 0.09), using the same technique and same species. Probably, this difference is due the diameter of the needle used (21G vs. 18G). According Bols et al. (1997), the needle diameter determines the quality of the recovered COCs. Thus, the lower the diameter of the needle, the greater the frictional force on the COC and therefore the greater the possibility of removal of *cumulus* cells (Morrison, 1959; Meyer, 1972). Yet, the period between ovary collection and oocyte recovery can influence the oocyte quality (Aman and Parks, 1994). Additionally, the ovaries used in this study had a storage period of 17 hours due to different Hours of collection of ovaries of pigs with semen collection of collared peccary.

The mean values for fresh semen characteristics from adult collared peccaries were similar to those described by Peixoto et al. (2012) and Castelo et al. (2010) in the same species.

In this study, only STR had a correlation with number of bound sperm ($R^2 = 61.7\%$). This parameter is a marker of sperm progression, indication of sperm hyperactivation and also describes sperm swimming patterns (Peña & Linde-Forsberg, 2000; Schettgen et al., 2002). Probably, this result appear to confirm that the linear spermatozoa, believed to have a great influence on fertility, can be functionally linked with a higher number of sperm bound, as was described in bull semen (Ferraz et al., 2014). The little correlation between semen parameters and *in vitro* interaction test using the swine oocytes may be attributed to the use of animals from a homogeneous group.

In spite that the multi-parameter evaluation of semen has been extensively reviewed, it is clear that the identification of one or more tests to accurately predict sperm fertility (Silva et al., 2006). The establishment of tests that assess the sperm functional

status, such as the sperm–oocyte interaction test (Oh et al., 2010) have greatly improved semen analysis in the swine, the domestic species more closely related to peccaries (Cavalcante-Filho et al., 1998). Therefore, combining conventional semen analysis with the results, such functional tests should provide a reliable method to assess the fertilizing ability of semen samples also in the peccaries, as first demonstrated in the present study.

In conclusion, the *in vitro* interaction test using the swine oocytes represents indicatives of collared peccary sperm *in vitro* penetration. Thus, it is suggested that this *in vitro* interaction test using heterologous oocytes can be used as an indicator for the functional evaluation of the fertilizing capacity of collared peccary sperm, demonstrating its application in the selection of different reproductive.

Acknowledgements

The authors would like to thank Dr. Moacir F. Oliveira from the CEMAS/UFERSA for providing the animals used in the experiments; and Dr. Marcelo Barbosa Bezerra from the Laboratory of Gonadal Transplantation and *in vitro* Production of Embryos/UFERSA for technical assistance. Lívia B. Campos, Andréia M. da Silva and Talyta L. Nunes were recipients of a grant from Coordenação de Aperfeiçoamento e Pessoal de Nível Superior – CAPES. Alexandre. R. Silva and Moacir F. Oliveira were recipient of a grant from CNPq.

References

- Abbott B, Van Kooten GC, 2011: Can domestication of wildlife lead to conservation? The economics of tiger farming in China. *Ecol Econ* 70,721–728.
- Aman RR, Parks JE, 1994: Effects of cooling and rewarming on the meiotic spindle and chromosomes of in vitro-matured bovine oocytes. *Biol Reprod* 50,103–110.
- Andrew J, Kouba MW, Atkinson, A, Rae G, Terri LR. 2001: Species-specific sperm-egg interaction affects the utility of a heterologous bovine in vitro fertilization system for evaluating antelope sperm. *Biol Reprod* 65, 1246–1251.

Berger T, Parker K. 1989: Modification of the zona-free hamster ova bioassay of boar sperm fertility and correlation with *in vivo* fertility. *Gam Res* 22,385–97.

Bertoldo M, Holyoake, PK, Evans G, Grupen CG 2010: Oocyte developmental competence is reduced in sows during the seasonal infertility period. *Reproduction. Fertil Dev* 22, 1222-1229.

Bols PEJ, Ysebaert MT, Soom AV, Kruif AD, Van Soom A, De Kruif A 1997: Effects of needle tip bevel and aspiration procedure on the morphology and developmental capacity of bovine compact cumulus oocyte complexes. *Theriogenology* 47, 1221-1236.

Bousquet D, Brackett BG. 1982: Penetration of zona-free hamster ova as a test to assess fertilizing ability of bull sperm after frozen storage. *Theriogenology* 17,199–212.

Canovas S, Coy P, Gomez E. 2007: First steps in the development of a functional assay for human sperm using pig oocytes. *J Androl* 28, 273–281.

Campos PC, Romar R, Ruiz S, Gadea J. 2001: Effects of maturational stage, cumulus cells and coincubation of mature and immature cumulus-oocyte complexes on *in vitro* penetrability of porcine oocytes. *Theriogenology* 55, 1489-1500.

Castelo TS, Bezerra FSB, Souza ALP, Moreira MAP, Paula VV, Oliveira MF, Silva AR. 2010: Influence of the thawing rate on the cryopreservation of semen from collared peccaries (*Tayassu tajacu*) using Tris-based extenders. *Theriogenology* 74, 1060-1065.

Cavalcante-Filho MF, Miglino MA, Machado GV, Bevilacqua EMAF, Neves WC. 1998: Comparative study of the morphology of the stomach of White lipped peccary (*Tayassu pecari*) and of the collared peccary (*Tayassu tajacu*). *Braz J Morphol Sci* 15, 203-207.

Comizzoli P, Mauget R, Mermillod P. 2001: Assessment of *in vitro* fertility of deer spermatozoa by heterologous IVF with zona-free bovine oocytes. *Theriogenology* 56, 261–274.

Corcini CD, Stephan MH, Colares EP, Santos EC, Varela Jr AS, Bongalhardo DC, Lucia Jr T. 2011: *In vitro* assays for vesper mice (*Calomys laucha*) sperm using heterologous substrates from nonrodent species. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol* 317, 96-102.

Ferraz MAMM, Morató R, Yeste M, Arcarons N, Pena AI, Tamargo C, Hidalgo CO, Muiño R, Mogas T. 2014: Evaluation of sperm subpopulation structure in relation to *in vitro* sperm–oocyte interaction of frozen-thawed semen from Holstein bulls. *Theriogenology*, 1–6.

Goudet G, Mugnier S, Callebaut I, Monget P. 2008: Phylogenetic analysis and identification of pseudogenes reveal a progressive loss of zona pelúcida genes during evolution of vertebrates. *Biol Reprod* 78, 796–806.

Guimarães L, Sequeiros J, Skirton H and Paneque M 2013: What counts as effective genetic counselling for presymptomatic testing in late-onset disorders? A study of the consultant's perspective. *J Genet Couns* 22,437-447.

Hanada A, Chang MC. 1972: Penetration of zona-free eggs by spermatozoa of different species. *Biol Reprod* 6,300–9.

Hewit DA, England GCW. 1997: The canine oocyte penetration assay; its use as an indicator of dog spermatozoal performance *in vitro*. *Anim Reprod Sci* 50, 123-139.

Hoque SAM, Kabiraj SK, Khandoker MAMY, Mondal A, Tareq KMA. 2011: Effect of collection techniques on cumulus oocyte complexes (COCs) recovery, in vitro maturation and fertilization of goat oocytes. *Afr J Biotechnol* 10, 9177-9181.

IUCN, IUCN Red List of Threatened Species, Version 2013. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 18 February 2014.

Januskausk ASA, Johannisson A, Soderquist L, Rodriguez-Martinez H. 2000: Assessment of sperm characteristics post-thaw and response to calcium ionophore in relation to fertility in Swedish dairy AI bulls. *Theriogenology* 53, 859–875.

Macedo Jr MC, Deschamps JC, Lucia Jr T, Bordignon J, Serret C, Rambo G, Pivato I, Schmitt E. 2006: In vitro penetration of fresh and vitrified swine oocytes by homologous spermatozoa using different incubation systems. *Anim Reprod Sci* 92,334-348.

Martínez E, Vázquez JM, Matas C, Roca J, Coy P, Gadea J. 1993: Evaluation of boar spermatozoa penetrating capacity using pig oocytes at the germinal vesicle stage. *Theriogenology* 40,547-557.

Mayor P, Galvez H, Guimarães DA, López-Gatius F, López-Béjar M. 2007: Serum estradiol-17beta, vaginal cytology and vulval appearance as predictors of estrus cyclicity in the female collared peccary (*Tayassu tajacu*) from the eastern Amazon region. *Anim Reprod Sci* 97,165-74.

Meyer H. 1972: Futterung und reproduktionsleistung von jung-und deckbullen. *Bayer Landwirtsch. Jahrb* 49,357-78.

Morrisson FB. 1959: Feeds and feeding. Ithaca, Morrison 69p.

Mugnier S, Dell'Aquila ME, Pelaez J, Douet C, Ambruosi B, De Santis T, Lacalandra GM, Lebos C, Sizaret PY, Delaleu B, Monget P, Mermillod P, Meyers SA, Goudet G. 2009: New insights into the mechanisms of fertilization: comparison of the fertilization steps, composition, and structure of the zona pellucida between horses and pigs. *Biol Reprod* 81,856–70.

Noguchi S, Yonezawa N, Katsumata T, Hashizume K, Kuwayama M, Hamano S, Watanabe S, Nakano M. 1994: Characterization of the zona pelúcida glycoproteins from bovine ovarian and fertilized eggs. *Biochim Biophys Acta* 1201, 7–14.

Nogueira SSC, Nogueira-Filho SLG. 2011: Wildlife farming: an alternative to unsustainable hunting and deforestation in Neotropical forests. *Biodivers Conserv* 20, 1385–1397.

Pena A, Linde-Forsberg C. 2000: Effects of Equex, one or two step dilution and two freezing thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. *Theriogenology* 54,859–75.

Peixoto GCX, Silva MA, Castelo TS, Silva AM, Bezerra JAB, Souza ALP, Oliveira MF, Silva AR. 2012: Individual variation related to testicular biometry and semen characteristics in collared peccaries (*Tayassu tajacu* Linnaeus, 1758). *Anim Reprod Sci* 134, 191– 196.

Rodríguez-Martínez H. 2013: Semen evaluation techniques and their relationship with fertility. *Anim Reprod* 10, 148-159.

Santos EAA, Sousa PC, Peixoto GCX, Simão BR, Oliveira MF, Silva AR. 2013: Establishing the hypoosmotic swelling test for sperm analysis in collared peccaries (*Pecari tajacu*). *Arq Bras Med Vet Zootec* 65,1257-1260

Silva AM, Peixoto GCX, Bezerra JAB, Castelo TS, Santos EAA, Silva AR. 2014: Relações entre a câmara de Neubauer a espectrofotometria utilizadas para a determinação da concentração espermática de catetos (*Pecari tajacu*). *Ciênc Rural* 44, 1494-1498.

Sinowatz F, Wessa E, Neumuller C, Palma G. 2003: On the species specificity of sperm binding and sperm penetration of the zona pellucida. *Reprod. Dom. Anim* 38, 141–146.

Sousa PC, Santos EAA, Souza ALP, Lima GL, Barros FFPC, Oliveira MF, Silva AR. 2013: Sperm morphological and morphometric evaluation in captive collared peccaries (*Pecari tajacu*). *Pesq. Vet. Bras* 33, 924-930.

Souza ALP, Lima GL, Peixoto GCX, Bezerra JAB, Silva AM, Oliveira MF, Silva AR. 2014: Innovative use of Aloe vera as a cryoprotectant for the collared peccaries (*Pecari tajacu*) semen freezing. V International Symposium on Animal Biology of Reproduction, 8-11.

Schettgen T, Koch HM, Drexler H, Angerer J. 2002: New gas chromatographic–mass spectrometric method for the determination of urinary pyrethroid metabolites in environmental medicine. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 778, 121–130.

Tartaglioni CM, Ritta MN, 2004: Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. *Theriogenology* 62, 1245–1252.

Verstegen, J.P., Iguer-Ouada, M., Onclin, K. 2002. Computer assisted semen analyzers in adrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, 57, 149-179.

Zhao XM, Song XX, Kawai Y, Niwa K. 2002: Penetration in vitro of zona-free pig oocytes by homologous and heterologous spermatozoa. *Theriogenology* 58,995-1006.

Yanagimachi R, Yanagimachi H, Rogers BJ. 1976: The use of zona-free animal ova as a test-system for the assessment of the fertilizing capacity of, human spermatozoa. *Biol Reprod* 15,471–476.

**CAPÍTULO 2 - IMPLEMENTING THE EGG PERIVITELLINE MEMBRANE
BINDING TEST FOR THE ANALYSIS OF FRESH AND FROZEN-THAWED
SPERM DERIVED FROM COLLARED PECCARIES (*Pecari tajacu*)**

**LB Campos¹, GCX Peixoto¹, AM da Silva¹, ALP Souza¹, TS Castelo¹, AF Pereira²,
AR Silva^{1*}**

¹Laboratory of Animal Germplasm Conservation (LCGA), Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró, RN, Brazil; ²Laboratory of Animal Biotechnology, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró, RN, Brazil

* Corresponding author: Laboratory of Animal Germplasm Conservation (LCGA), Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró, RN, Brazil. Tel.: +55 84 3317 8374

E-mail address: legio2000@yahoo.com (A.R. Silva).

Submetido à Revista Animal Reproduction Science em 20/01/2015

Abstract

The aim of the present study was to evaluate the binding capacity of collared peccaries (*Pecari tajacu*) fresh and frozen sperm by using the egg perivitelline membrane binding test. Moreover, we establish the relations among sperm parameters and the binding test. Ejaculates from eleven adult males were collected by electroejaculation and frozen in a Tris-based extender plus egg yolk (10%), *Aloe vera* (10%) and glycerol (3%). Fresh and frozen-thawed samples were evaluated for sperm motility, vigor, viability, normal morphology, membrane integrity, and kinetic parameters by CASA. In addition, samples were analyzed by an egg perivitelline membrane binding test that was conducted under a humidified atmosphere containing 5% CO₂ and 95% air for 20 min at 38.5°C. A simple linear regression model was used to identify associations between egg perivitelline membrane binding test (dependent variables) and sperm parameters (independent variables). We prove the capability of collared peccary sperm in binding to the hen yolk perivitelline membrane, and we found sperm bound in all the membranes used in the experiment (a total of 100%). In fresh samples, we identify 140.6 ± 19.4 sperm bound to the perivitelline membrane, while in frozen-thawed samples, a total of 125.1 ± 5.5 sperm were found ($P > 0.05$). Significant associations between frozen/thawed sperm bound to perivitelline membrane and various sperm parameters as vigor (54.6%), the amplitude lateral head ($R=55.1\%$), the beat cross frequency ($R=76.8\%$), the straightness ($R=61.8\%$) and the linearity ($R=62.2\%$) were found. Therefore, showing that such parameters present a predictive value for the sperm binding capability in peccaries. In conclusion, the yolk perivitelline membrane-binding test is a reliable, practical, and relatively simple method and could be efficiently incorporated to the routine analysis of collared peccary semen samples.

Keywords: semen, *Tayassu tajacu*, wild pig, electroejaculation.

1. Introduction

In spite of collared peccary (*Pecari tajacu*) is currently classified as stable populations (IUCN, 2014), it is disappearing in Caatinga and Atlantic Forest biomes (Gongora et al., 2011). In this context, its breeding under captivity has been stimulated, mainly because the international appreciation of its meat and pelt (Oliveira et al., 2011). Therefore, the optimization of protocols for its sperm cryopreservation would allow the formation of germplasm banks, which could contribute for peccary conservation and multiplication (Silva et al., 2010). By this moment, there are only few reports on peccary semen preservation at using Tris (Castelo et al., 2010) or coconut water (Silva et al., 2012; Campos et al., 2014) extenders. In these studies, the efficiency of semen freezing protocols is limited to the analysis of sperm parameters as cells motility, viability and integrity, which could not provide a real indication of the functional cell competence.

Considering that artificial insemination techniques are still under developing process for the peccaries, it is necessary to search for alternative methods for the evaluation of sperm fertilizing ability. Due to the orthologous similarity among glycoproteins from the zona pellucida of mammal oocytes and proteins from chicken egg perivitelline membrane (Takeuchi et al., 1999; Wassaman, 1999; Smith et al., 2005; Mugnier et al., 2009), male potential fertility could be estimated by binding of sperm to perivitelline membrane, assuming that it would be related to sperm binding to oocytes. This technique is relatively simple and requires inexpensive equipment (Criscuolo et al., 2010). Additionally, it is unnecessary to use oocytes, which makes it a hard requirement for certain wild species (Corcini et al., 2012).

This test has been successfully used to determine the fertilizing capacity of fresh semen poultry (Robertson et al., 1997), mice, humans (Barbato et al., 1998), and Vesper mice – *Calomys laucha* (Corcini et al., 2011), as of cryopreserved semen samples, described in bull (Losano et al., 2015), goat (Dias et al., 2013) and pig (Pinho et al., 2012). The combination of this test with semen analysis should provide a reliable method to assess the fertilizing ability of semen samples. In ruminants, some authors found positive associations between number of sperm bound to the perivitelline membrane and its motility, plasma membrane integrity and variables provided by the CASA (Dias et al., 2013; Losano et al., 2015). The existence of such associations in peccaries could be an additional indicative for the sperm quality, especially for the selection of frozen semen samples.

The aim of the present study was to evaluate the binding capacity of collared peccaries fresh and frozen sperm by using the egg perivitelline membrane binding test. Moreover, we establish the relations among sperm parameters and the binding test.

2. Material and methods

2.1. Ethics and chemicals

The ethics committee of the Universidade Federal Rural do Semi-Árido (CEUA/UFERSA) approved the experimental protocols as well as the animal care procedures used (Process N°. 23091.004271/2014-71). All reagents were obtained from Sigma Aldrich (St. Louis, USA).

2.2. Animals and management

A total of 11 sexually mature male collared peccaries were used. The animals belonged to the Centre of Multiplication of Wild Animals (CEMAS/UFERSA), located in the

northeast of Brazil (Mossoró, RN, Brazil; 5°10' = S, 37°10' = W). The climate is typical semi-arid, with an average annual temperature of 27°C. The animals were isolated from females 6 months before the commencement of the study and maintained under a 12 h natural photoperiod. They were maintained outdoors in groups of six in paddocks (20 x 3 m) with a covered area of 3 x 3 m and fed with swine food and fruits. Water was provided *ad libitum*.

2.3. Semen collection and evaluation

The semen collection was performed in the period from September to October. Animals were fasted 12 h before the experiments began. They were then physically restrained using a hand net and anesthetized using intravenous administration of propofol (Propovan, Cristalia, Fortaleza, Brazil), given as a bolus (5 mg/kg – Souza et al., 2009). The males were kept in lateral recumbency, and semen was collected with an electroejaculator (Autojac, Neovet, Campinas, Brazil) connected to a 12 V source (Castelo et al., 2010). Semen was collected in plastic tubes and immediately evaluated.

Sperm motility and kinetic rating (0–5, with 0 and characterized by no movement and progressive forward movement, respectively) were assessed immediately by evaluating a sample (5 µL) using light microscopy at 100× and 400× magnification, respectively. Brome-phenol blue-stained smears were prepared with 5 µL of semen for evaluating sperm viability and morphology using light microscopy (1000×), counting 200 cells per slide (Souza et al., 2013). Following the initial assessment, 5 µL semen aliquot was diluted in 10% buffered formalin (1 mL) and sperm concentration was determined using a Neubauer counting chamber (Silva et al., 2014). The functional integrity of the sperm membrane was evaluated by its osmotic response to a hypo-osmotic swelling (HOST) test, using distilled water (0 mOsm/L) as the hypo-osmotic solution (Santos et

al., 2013). Plasma membrane integrity was assessed with a fluorescent solution containing the fluorophores 6-carboxy-fluorescein diacetate (C-FDA) and propidium iodide (PI), as validated for the species (Souza et al., 2014).

The sperm motility kinetic parameters was assessed by a Computer Assisted Semen Analysis – CASA (IVOS 12.0, Hamilton-Thorne, Beverly, USA). The following parameters were analyzed: the number of counted cells; the percentage of total motile sperm; the percentage of progressive motile sperm; velocity average pathway – VAP (mm/s); the velocity straight line – VSL (mm/s); the curvilinear velocity – VCL (mm/s); the amplitude lateral head – ALH (mm); the beat cross frequency – BCF (Hertz); the straightness – STR (%); and the linearity – LIN (%). According to low VAP cut-off (LVV) and medium VAP cut-off (MVV), the overall sperm population was subdivided in four categories: rapid, with $VAP > MVV$; medium, with $(LVV < VAP < MVV)$; slow, with $VAP < LVV$; and static, the proportion of cells that were not moving (Verstegen et al., 2002).

2.4. Sperm cryopreservation and thawing

Semen samples were diluted in Tris extender supplemented of egg yolk (10%) and *Aloe Vera* (10%) at 27°C (Souza et al., 2015). After dilution, samples were stored in the water jacket at 27°C and equilibrated for 40 min to reach 15°C in a biological oxygen demand (BOD) incubator (Quimis, Diadema, Brazil). Further, BOD incubator was adjusted to establish at 5 °C for 30 min. At that point, the sample was added to the extender with 6% glycerol (also at 5 °C), which resulted in a final concentration of 3% glycerol in the extender. Samples were packed in 0.25 mL plastic straws (IMV Technologies; L'Aigle, France) that were placed horizontally in an insulated box for 5 min, at 5 cm above the nitrogen (N₂) vapors, and then plunged into N₂ for storage at –196°C, following a fast

freezing rate at $-40^{\circ}\text{C}/\text{min}$. After one week, samples were thawed in a water bath at 37°C for 1 min, and frozen/thawed semen was evaluated.

2.5. Egg perivitelline membrane binding test

The test was conducted for fresh and frozen-thawed sperm samples, as reported by Macedo et al. (2006). The perivitelline membranes were obtained from fresh and non-fertile hen eggs. The perivitelline membrane was prepared by separating the egg yolk from the albumen. The intact yolks were placed on parafilm and the membrane separated and washed with saline solution (NaCl, 0.9%). Then, the membrane was placed in a Petri dish and cut into squares ($1 \times 1 \text{ cm}$), each piece being placed in four-well plates containing the incubation medium. This medium was constituted of 114 mM NaCl; 3.1 mM KCl; 0.4 mM NaH_2PO_4 ; 10 mM calcium lactate; 25 mM NaHCO_3 ; 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ phenol red; 1.4 mM caffeine; 2.0 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0.5 mM MgCl_2 ; 10 mM Hepes; 6 mg/mL BSA; 0.45 mM sodium pyruvate; 5.5 mM glucose; 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gentamicin sulfate; pH 7.4-7.8.

After evaluation, sperm samples were washed in incubation medium (1:1), and centrifuged (700 $\times g$ for 10 min) at room temperature. The supernatant was discarded and the pellet was diluted in incubation medium, being the concentration adjusted to 1×10^6 motile sperm/mL. The sperm cell suspension was added to the perivitelline membrane at a final volume of 500 μL , for 20 min at 38.5°C under a humidified atmosphere containing 5% CO_2 and 95% air. A minimum of 2 perivitelline membranes (two droplets) was used per replicate.

After co-incubation, the perivitelline membranes were washed for removal of loosely attached sperm, and stretched over a slide. The membranes were stained with Hoechst 33358 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and the sperm bound to it were counted, using an epifluorescence microscopy (Episcopic Fluorescent attachment EFA Halogen Lamp Set,

Leica, Kista, Sweden) at 400×. For each sample, all sperm that were attached to the membrane in six different fields were counted, and the mean of adhered sperm was estimated (Barbato et al., 1998).

2.5. Data analyses

The results were expressed as means ($\pm$ S.D.) and analyzed by Statview 5.0 software (SAS Institute Inc., Cary, USA). A simple linear regression model was used to identify associations between egg perivitelline membrane binding test (dependent variables) and sperm parameters (independent variables). Probabilities < 0.05 were considered significant.

3. Results

Fresh ejaculates presented watery aspect, white color, and a volume of 2.0 ± 0.4 mL with a concentration of $259.2 \pm 29.3 \times 10^6$ sperm/mL. Mean values ($\pm$ S.D.) for fresh and frozen-thawed sperm parameters are shown in Tables 1 and 2.

Table 1. Mean values ($\pm$ S.D.) for fresh and frozen/thawed semen characteristics collected from adult collared peccaries (*Pecari tajacu*) by electroejaculation (n = 11 ejaculates).

Parameters	Semen	
	Fresh	Frozen/thawed
Sperm motility (%)	95.9 ± 4.9	42.7 ± 14.1
Vigor (0–5)	4.8 ± 0.0	3.0 ± 1.4
Viability (%)	87.4 ± 7.8	35.8 ± 2.8
Osmotic response (%)	83.2 ± 7.1	41.3 ± 6.4
Membrane integrity (%)	81.0 ± 8.17	41.0 ± 5.6
Normal sperm morphology (%)	53.6 ± 34.6	55.8 ± 19.1

Table 2. Kinetic motility patterns (mean $\pm$ S.D.) observed in collared peccary (*Pecari tajacu*) fresh and frozen/thawed sperm (n = 11) by computerized assisted semen analysis – CASA.

Sperm motility patterns	Semen	
	Fresh	Frozen/thawed
Total motility (%)	87.4 $\pm$ 1.4	40.6 $\pm$ 39.6
Progressive motility (%)	64.3 $\pm$ 11.3	16.4 $\pm$ 22.6
Velocity average pathway ($\mu\text{m/s}$)	65.5 $\pm$ 11.2	42.5 $\pm$ 3.7
Velocity straight line ($\mu\text{m/s}$)	47.4 $\pm$ 9.7	28.1 $\pm$ 2.2
Velocity curvilinear ($\mu\text{m/s}$)	124.7 $\pm$ 20.8	93.7 $\pm$ 8.8
Amplitude lateral head (μm)	6.6 $\pm$ 0.6	7.2 $\pm$ 0.3
Beat cross frequency (Hz)	35.5 $\pm$ 1.5	34.2 $\pm$ 1.0
Straightness (%)	70.5 $\pm$ 2.1	64.4 $\pm$ 0.7
Linearity (%)	39.4 $\pm$ 0.7	31.2 $\pm$ 0.0
Sperm subpopulations		
Rapid (%)	79.2 $\pm$ 9.2	22.5 $\pm$ 29.0
Medium (%)	8.2 $\pm$ 7.8	18.0 $\pm$ 11.3
Slow (%)	2.8 $\pm$ 0.7	8.4 $\pm$ 2.8
Static (%)	9.7 $\pm$ 22.67	51.0 $\pm$ 43.1

All the slices of yolk perivitelline membrane presented sperm bound to it, both for fresh or frozen-thawed sperm samples (100%). No differences were found regarding the number of sperm bound to perivitelline membrane between fresh and frozen-thawed samples (Table 3). Moreover, we found significant associations among various frozen-thawed sperm parameters and the egg perivitelline membrane binding test, as presented in Table 4.

Table 3. Mean ($\pm$ S.D.) and range values for collared peccary (*Pecari tajacu*) fresh and frozen-thawed sperm bound to the hen yolk perivitelline membrane (n = 11).

Sperm	Mean $\pm$ S.D.	Binding range
Fresh	140.6 $\pm$ 19.4	33.9 – 308.7
Frozen/thawed	125.1 $\pm$ 5.5	49.8 – 250.7
P > 0.05		

Table 4. Linear regression analysis to assess the associations among fresh or frozen-thawed sperm parameters and the number of sperm bound to hen yolk perivitelline membrane in collared peccaries (*Pecari tajacu*; n = 11).

Sperm parameters	Number of bound sperm			
	Fresh		Frozen/thawed	
	R (%)	P	R (%)	P
Motility	9.4	0.7834	19.7	0.5617
Vigor	34.4	0.3009	54.6*	0.0821
Viability	55.1	0.0789	5.0	0.8839
Osmotic response	12.5	0.7135	0.1	0.9976
Functional membrane integrity	17.0	0.6163	2.0	0.9540
Normal sperm morphology	42.6	0.1912	17.8	0.5997
Velocity average pathway	26.3	0.4348	24.0	0.4768
Velocity straight line	46.7	0.1476	38.7	0.2391
Velocity curvilinear	2.9	0.9332	16.1	0.6355
Amplitude lateral head	43.9	0.1766	55.1*	0.0793
Beat cross frequency	36.5	0.2698	76.8*	0.0057
Straightness	53.8	0.0880	61.8*	0.0428
Linearity	71.3	0.0139	62.2*	0.0408
Total motile sperm	45.4	0.1610	8.8	0.7963
Progressively motile	59.2	0.0550	19.9	0.5574
Subpopulations				
Rapid	44.2	0.1733	11.9	0.7264
Medium	2.3	0.9475	28.0	0.4047
Slow	68.8	0.0193	11.4	0.7384
Static	43.4	0.1826	10.2	0.7647

* (P < 0.05)

4. Discussion

In spite that the multi-parameter evaluation of semen has been extensively reviewed, it is clear that the identification of one or more tests to accurately predict sperm fertility,

mainly in cryopreserved samples is necessary (Silva et al., 2006). The establishment of tests that assess the sperm functional status, such as the sperm–oocyte interaction test (Oh et al., 2010) and the egg perivitelline membrane binding test (Corcini et al., 2012), have greatly improved semen analysis in the swine, the domestic species more closely related to peccaries (Cavalcante-Filho et al., 1998). Therefore, combining conventional semen analysis with the results, such functional tests should provide a reliable method to assess the fertilizing ability of semen samples also in the peccaries, as first demonstrated in the present study.

In general, all the perivitelline membranes used in the experiment presented sperm bound to it, proving the capability of collared peccary sperm in binding to the hen yolk. It is known that perivitelline membrane glycoproteins present orthologous similarity to those found in the zona pellucida of mammal oocytes. It is known that the terminal *N*-acetyl-D-glucosamine, present in the zona pellucida, play an essential role in the fixation of the sperm membrane and the subsequently acrosome reaction. Robertson et al. (2000) demonstrate that this terminal is also present in the hen yolk perivitelline membrane. Thus, the sperm-binding test using the perivitelline membrane would be efficient to predict the fertilizing capacity of semen, since sperm binding to these proteins is a crucial stage for fertilization (Criscuolo et al., 2010).

In fresh samples, the average number of peccary sperm bound to the perivitelline membrane (140.6 ± 19.4) was higher than that verified for domestic swine (72.0 ± 17.7 – Corcini et al., 2012). In frozen-thawed samples, the average number of peccaries sperm bound to perivitelline membrane was 125.1 ± 5.5 . Such value is lower than those described for swine semen cryopreserved in Beltsville thawing solution (BTS) supplemented of lactose 11%, egg yolk (20%), glycerol (6%) and Orvus ES paste (1.5%), and incubated in BTS and B-TALP media with different sperm concentrations (20 or 40

x 10⁶ sperm / ml) (Pinho et al., 2012). The authors report values varying from 157.0 to 245.2 swine frozen-thawed sperm bound to perivitelline membrane and suggest that different incubation systems and cryopreservative protocols, and also the sperm concentration used, could influence the results derived from the test. Such suggestion provides a good indicative that the test is capable to identify differences in sperm derived from different treatments, as cryoprotectants, freezing curves, thawing rates, and others.

When comparing peccaries fresh and frozen-thawed samples, no differences were found regarding the number of sperm bound to perivitelline membrane. Pinho et al. (2012) described similar results for domestic swine semen in an identical study, suggesting that the cellular damage originated from the freezing process would be not enough to interfere in the test. Probably, in peccaries, the freezing-thawing processes adopted also did not affect the surface structures that are responsible for the membrane binding in viable sperm.

At present study, the mean percentage of fresh sperm bound to the perivitelline membrane ranged from 33.9 to 308.75, while in cryopreserved samples, a range of 49.83 to 250.75 was observed. In swine, the authors affirm that the variation appears to be higher than in other species, although the reason is not known (Reis et al., 2003). Such large variation seems to be also present in the peccaries. In fact, Peixoto et al. (2012) identified that semen characteristics in this species presents large variations among individuals. Therefore, if the individual variation would also be reflected in the capability of sperm in binding the perivitelline membrane, the use of this assay would be helpful in the selection of semen donors.

After cryopreservation, a significant association between frozen/thawed sperm bound to perivitelline membrane and sperm vigor (54.6%) was found. According to Dias et al. (2013), the greater the movement and force of movement, the higher the binding

capacity and sperm fertilization. Furthermore, we demonstrated significant relations between the number of sperm bound to perivitelline membrane and some variables provided by the CASA such as ALH (R=55.1%), BCF (R=76.8%), STR (R=61.8%) and LIN (R=62.2%). Similar results were described for bull cryopreserved semen (Losano et al., 2015) in which the perivitelline membrane test was positively correlated to total and progressive motility, ALH, STR, LIN, and fast, medium and slow sperm. According to Peña and Linde-Forsberg (2000), values for ALH, BCF, STR and LIN could be an indicative of sperm hyperactivation, which movement patterns are required for the initial stages of *in vitro* fertilization (Verstegen et al., 2000). Thus, modifications in these parameters could indicate alterations related to the sperm fertilizing capacity also in collared peccary semen.

In general, the yolk perivitelline membrane-binding test is specially indicated for assessing differences among individuals or semen treatments. A great advantage of this test is the possibility of fragmenting a unique egg yolk in slices to be used in different samples (Csermak Junior, 2011). Furthermore, it is easier to acquire the hen yolk membranes than the oocytes, specially derived from wild animals as the collared peccaries. Therefore, the use of this sperm-binding assay could be useful as an analysis indicative of the fertilizing capacity of cryopreserved collared peccaries semen, as described in boars (Pinho et al., 2012), goats (Dias et al., 2013) and bulls (Losano et al., 2015).

In conclusion, the present findings indicate that the yolk perivitelline membrane-binding test is a reliable, practical, and relatively simple method that could be efficiently incorporated to the routine analysis of collared peccary semen samples. Its indication for comparing semen donors or treatments would be specially appreciated in the selection of

individuals destined to reproductive programs, mainly related to the use of assisted techniques as the semen cryopreservation.

Acknowledgements

The authors would like to thank Dr. Moacir F. Oliveira from the CEMAS/UFERSA for providing the animals used in the experiments; and Dr. Marcelo Barbosa Bezerra from the Laboratory of Gonadal Transplantation and *in vitro* Production of Embryos/UFERSA for technical assistance. Livia B. Campos, Gislayne C.X. Peixoto, Andréia M. da Silva, and Ana Liza P. Souza were recipients of a grant from Coordenação de Aperfeiçoamento e Pessoal de Nível Superior – CAPES. Alexandre. R. Silva was recipient of a grant from CNPq.

5. References

- Barbato, G.F., Cramer, P.G., Hammerstedt, R.H. 1998. A practical *in vitro* sperm-egg binding assay that detects subfertile males. *Biol. Reprod.* 58, 686-699.
- Campos, L.B., Silva, M.A., Bezerra, J.A.B., Castelo, T.S., Peixoto, G.C.X., Silva, A.R. 2014. Sobrevivência de espermatozoides de catetos (*Pecari tajacu*) após congelação-descongelação no uso de diferentes diluentes [Survival of collared peccaries (*Pecari tajacu*) sperm after freezing-thawing using different extenders]. *Acta Sci. Vet.* 42, 1217.
- Castelo, T.S., Bezerra, F.S.B., Souza, A.L.P., Moreira, M.A.P., Paula, V.V., Oliveira, M.F., Silva, A.R. 2010. Influence of the thawing rate on the cryopreservation of semen

- from collared peccaries (*Tayassu tajacu*) using Tris-based extenders. *Theriogenology* 74, 1060-1065.
- Cavalcante-Filho, M.F., Miglino, M.A., Machado, G.V., Bevilacqua, E.M.A.F., Neves, W.C. 1998. Comparative study of the morphology of the stomach of White lipped peccary (*Tayassu pecari*) and of the collared peccary (*Tayassu tajacu*). *Braz. J. Morphol. Sci.* 15, 203-207.
- Csermak Junior, A.C. 2011. Uso de sondas fluorescentes e do ensaio de ligação do espermatozoide do cão (*Canis lupus familiaris*) à membrana perivitelina de ovo de galinha (*Gallus gallus*) como método para predição da capacidade fertilizante do sêmen [Use of fluorescent probes and assay of binding dog sperm (*Canis lupus familiaris*) to the perivitelline layer on the chicken egg (*Gallus gallus*) as a method for predicting the fertilizing capacity of semen]. Doctoral Thesis, Viçosa, Brazil. 83p.
- Corcini, C.D., Silva, B.E., Brizolara, R.M.R., Gheller, S.M.M., Varela Junior, A.S., Bongalhardo, D.C., Lucia Junior, T. 2012. 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 [Calcium lactate concentration and incubation period on the binding and penetration capacity of swine sperm in the perivitelline membrane of chicken egg]. *Ci. Rur.* 42,142–146.
- Corcini, C.D., Stephan, M.H., Colares, E.P., Santos, E.C., Varela Junior, A.S., Bongalhardo, D.C., Lucia Junior, T. 2011. In vitro assays for vesper mice (*Calomys laucha*) sperm using heterologous substrates from non-rodent species. *J Exp Zool A Ecol. Genet. Physiol.* 317, 96-102.
- Criscuolo, T., Rocha, A.M., Semaco, T., Serzedelo, T., Alegretti, J.R., Serafini, P., Motta, E.L.A. 2010. Motile sperm binding to the egg yolk membrane is an easy and feasible function test for acrosome integrity. *J. Bras. Reprod. Assist.* 14, 29-32.

- Dias, J.C.O., Santos, M.C.R., Penitente Filho, J.M., Oliveira, G.D., Mendes, V.R.A., Mancio, A.B. 2013. Teste de ligação do espermatozoide à membrana perivitelina da gema de ovo após adição de ringer lactato, citrato de sódio 2,92% e solução tris no sêmen caprino descongelado [Sperm-perivitelline membrane egg binding assay addition of Ringer lactate, sodium citrate 2.92% and Tris solution in thawed goat semen]. *Acta Vet. Bras.* 7, 300-305.
- Gongora, J.C., Biondo, J.D., Cooper, A., Taber, A., Keuroghlian, M., Altrichter, González, S. 2011. Revisiting the species status of *Pecari maximus* van Roosmalen et al., 207 (Mammalia) from the Brazilian Amazon. *Bonn Zoological Bulletin*, 60, 95-101.
- IUCN, IUCN Red List of Threatened Species, Version 2013. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 18 February 2014.
- Losano, J.D., Angrimani, D.S., Pereira, R.J., Rocha, A.M., Criscuolo, T.S., Barnabe, V.H., Barnabe, R.C., Mendes, C.M., Assumpção, M.E., Nichi, M. 2015. Utilization of sperm-binding assay combined with computer-assisted sperm analysis to evaluate frozen-thawed bull semen. *Andrologia* 47, 77-84.
- Macedo-Junior, M.C., Deschamps, J.C., Lucia Junior, T., Bordignon, J., Serret, C., Rambo, G., Pivato, I., Schmitt, E. 2006. In vitro penetration of fresh and vitrified swine oocytes by homologous spermatozoa using different incubation systems. *Anim. Reprod. Sci.* 92, 334-348.
- Mugnier, S., Aquila, M.E.D., Pealez, J., Douet, C., Ambruosi, B., Santis, T.D., Lacalandra, G.M., Lebos, C., Sizaret, P.Y., Delaleu, B., Monget, P., Mermillod, P., Meyers, S.A., Goudet, G. 2009. 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.* 81, 856-870.

- Oh, S.A., You, Y.A., Park, Y.J., Pang, M.G. 2010. The sperm penetration assay predicts the litter size in pigs. *Int. J. Androl.* 33, 604–612.
- Oliveira, S.D., Mendes, A., Nogueira, S.S.C., Nogueira-Filho, S.L.G. 2011. A criação de caititus (*Tajassu tajacu*) como alternativa de diversificação de produção e renda na região Cacaueira da Bahia, Brasil. *MEMORIAS: Manejo de Fauna silvestres em Amazonia y Latinoamérica*, 247-256.
- Peixoto, G.C.X., Silva, M.A., Castelo, T.S., Silva, A.M., Bezerra, J.A.B., Souza, A.L.P., Oliveira, M.F., Silva, A.R. 2012. Individual variation related to testicular biometry and sêmen characteristics in collared peccaries (*Tayassu Tajacu* Linnaeus, 1758). *Anim. Reprod. Sci.* 134, 191-196.
- Peña, A, Linde-Forsberg, C. 2000. Effects of Equex, one or two step dilution and two freezing thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. *Theriogenology* 54: 859-875.
- Pinho, R.O., Shiomi, H.H., Lima, D.M.A., Costa, E.V., Santos, M.C.R., Lopes, P.S., Guimarães, S.E.F., Guimarães, J.D. 2012. 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 hen's egg perivitelline membrane]. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 36, 245-249.
- Reis, G.R., Bernardi, M.L., Wentz, I., Bortolozzo, F.P., Weitze, K.F., Amann, R., Kellers, C., Zemmrich, J. 2003. Fertilidade de sêmen suíno avaliada pelo teste de ligação dos espermatozoides a um substrato sintético [Boar semen fertility evaluated by na sperm-binding assay to a synthetic substrate]. *Pesq. Agropec. Bras.* 38, 1343-1349.
- Robertson, L., Wishart, G.J., Horrocks, A.J. 2000. Identification of perivitelline N-linked glycans as mediators of sperm-egg interaction in chickens. *J. Reprod. Fertil.* 120, 397-403.

- Robertson, L., Brown, H.L., Staines, H.J., Wishart, G.J. 1997. Characterization and application of an avian in vitro spermatozoa-egg interaction assay using the inner perivitelline layer from laid chicken eggs. *J. Reprod. Fertil.* 110, 205-211.
- Santos, E.A.A., Sousa, P.C., Peixoto, G.C.X., Simão, B.R., Oliveira, M.F., Silva, A.R. 2013. Establishing the hypoosmotic swelling test for sperm analysis in collared peccaries (*Pecari tajacu*). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 65, 1257-1260.
- Silva, A.M., Peixoto, G.C.X., Bezerra, J.A.B., Castelo, T.S., Santos, E.A.A., Silva, A.R. 2014. Relações entre a câmara de Neubauer a espectrofotometria utilizadas para a determinação da concentração espermática de catetos (*Pecari tajacu*) [Relationship between Neubauer counting chamber and spectrophotometer used for the sperm concentration determination in collared peccaries (*Pecari tajacu*)]. *Ci. Rur.*, 44, 1494-1498.
- Silva, M.A., Peixoto, G.C.X., Lima, G.L., Bezerra, J.A.B., Campos, L.B., Paiva, A.L.C., Paula, V.V., Silva, A.R. 2012. Cryopreservation of collared peccaries (*Tayassu tajacu*) semen using a powdered coconut water (ACP-116c) based extender plus various concentrations of egg yolk and glycerol. *Theriogenology* 78, 605-611.
- Silva, A.R., Castelo, T.S., Lima, G.L., Peixoto, G.C.X. 2010. Conservation of germplasm from wild animals of the Caatinga biome. *Acta Sci Vet*, 38, 373-389.
- Silva, A.R., Cardoso, R.C.S., Silva, L.D.M., Chirinéa, V.H., Lopes, M.D., Souza, F.F. 2006. Prognostic value of canine frozen-thawed semen parameters on in vitro sperm-oocyte interactions. *Theriogenology* 66, 456-62.
- Smith, J., Paton, I.R., Hughes, D.C., Burt, D.W. 2005. Isolation and mapping the chicken zona pellucida genes an insight into the evolution of orthologous genes in different species. *Mol. Reprod. Dev.* 70, 133-145.

- Sousa, P.C., Santos, E.A.A., Souza, A.L.P., Lima, G.L., Barros, F.F.P.C., Oliveira, M.F., Silva, A.R. 2013. Sperm morphological and morphometric evaluation in captive collared peccaries (*Pecari tajacu*). Pesq. Vet. Bras, 33, 924-930.
- Souza, A.L.P., Lima, G.L., Peixoto, G.C.X., Castelo, T.S., Bezerra, J.A.B., Silva, A.R. 2014. Use of fluorescent probes for the assessment of plasma membrane of collared peccaries (*Pecari tajacu*) sperm. Proc. Braz. Congr. Anim. Reprod. 20, 121.
- Souza, A.L.P., Castelo, T.S., Queiroz, J.P.A.F., Barros, I.O., Paula, V.V. 2009. Evaluation of anesthetic protocol for the collection of semen from captive collared peccaries (*Tayassu tajacu*) by eletroejaculation. Anim. Reprod. Sci. 116, 370-375.
- Souza, A.L.P., Lima, G.L., Peixoto, G.C.X., Bezerra, J.A.B., Silva, A.M., Oliveira, M.F., Silva, A.R. 2015. Innovative use of *Aloe vera* as a cryoprotectant for the collared peccaries (*Pecari tajacu*) semen freezing. Anim. Reprod. 12, 274.
- Takeuchi, Y., Nishimura, K., Aoki, K., Adachi, T., Sato, C., Kitajima, K., Matsuda, T. 1999. A kDa glycoprotein from chicken egg-envelope, an avian homolog of the ZPC Family glycoproteins in mammalian zona pellucida. Europ. J. Biochem. 260, 736-742.
- Verstegen, J.P., Iguer-Ouada, M., Onclin, K. 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. Theriogenology 57, 149-179.
- Wassarman, P.M., 1999. Mammalian fertilization: Molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis, and fusion. Cell 96, 175-183

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Haja vista o interesse na exploração comercial, bem como, na preservação dos catetos (*Pecari tajacu*), surge a necessidade de um melhor conhecimento acerca do potencial reprodutivo dos machos. Neste sentido, o desenvolvimento de testes *in vitro* capazes de predizer a capacidade fecundante dos espermatozoides poderia ser de grande importância para a análise de rotina.

O presente estudo demonstrou que espermatozoides de catetos são capazes de promover interações com oócitos suínos. A partir desta informação, sugere-se que este teste de interação *in vitro* utilizando heterólogos possa ser utilizado como um indicativo para a avaliação funcional da capacidade fecundante de espermatozoides de catetos, denotando sua aplicação na seleção de diferentes reprodutores.

Adicionalmente, o teste de ligação à membrana perivitelina da gema de ovo de galinha é um método confiável, prático e relativamente simples e que pode ser eficientemente incorporado à análise de rotina de amostras de sêmen de catetos. Este teste é indicado na comparação de doadores ou tratamentos seminais, especialmente na seleção de indivíduos destinados a aplicações de técnicas assistidas como a criopreservação de sêmen.

Esse conhecimento permitirá a utilização de testes laboratoriais alternativos para selecionar os machos férteis, quanto a sua capacidade de fecundação, mimetizando *in vitro* o que possivelmente ocorreria *in vivo*, melhorando assim o aproveitamento desses reprodutores dentro de uma sistema produtivo. Ainda, o teste possibilita estabelecer protocolos eficazes de criopreservação que permitirão a formação de bancos de germoplasma, úteis para a conservação e multiplicação da espécie.

ANEXOS

ANEXO A – CARTA DE SUBMISSÃO DO ARTIGO: “**IMPLEMENTING THE EGG’S PERIVITELLINE MEMBRANE BIDDING TEST FOR THE ANALYSIS OF FRESH AND FROZEN-THAWED SPERM DERIVED FROM COLLARED PECCARIES (*Pecari tajacu*)**” À REVISTA ANIMAL REPRODUCTION SCIENCE
20 – JAN – 2015

22/01/2015

Mensagem de Impressão do Outlook.com

[Imprimir](#)[Fechar](#)

De: **Alex Rodrigues** (legio2000@yahoo.com)
 Enviada: terça-feira, 20 de janeiro de 2015 19:16:53
 Para: Livia Campos (livia_campos86@hotmail.com)

Em Terça-feira, 20 de Janeiro de 2015 16:15, ANIREP <ees.anirep.0.2ebda5.29b275b1@eesmail.elsevier.com> escreveu:

Title: Implementing the egg's perivitelline membrane bidding test for the analysis of fresh and frozen-thawed sperm derived from collared peccaries (*Pecari tajacu*)
 by: Livia B Campos, M.Sc.; Gislayne C X Peixoto, MSc; Andreia M Silva, graduate; Ana Liza P Souza, Dr.; Thibério S Castelo, Dr.; Alessandra F Pereira, Dr.; Alexandre Rodrigues Silva, Dr
 Research Paper

Dear Prof. Silva,

Your submission has been received by the journal
 Animal Reproduction Science.

You will be able to check on the progress of your paper by logging onto the Elsevier Editorial Systems as an Author using the following information:

<http://ees.elsevier.com/anirep/>

Your username is: legio2000@yahoo.com

If you need to retrieve password details, please go to:

http://ees.elsevier.com/anirep/automail_query.asp

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Editorial Office Staff
 Animal Reproduction Science

For further assistance, please visit our customer support site at
<http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

ANEXO B – FOTO:

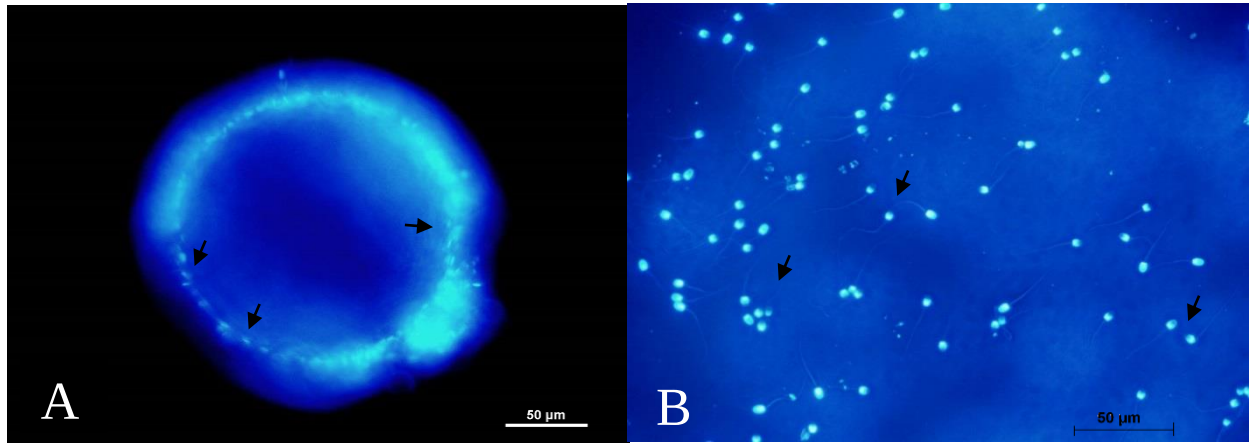


Figura 2 – Espermatozoides de catetos (*Pecari tajacu*) (setas) ligados a zona pelúcida de oócitos de suínos (A) e a membrana perivitelina (B).

ANEXO C - Preparo das Soluções Utilizadas no Teste de Penetração *in vitro* com Oócitos Heterólogos e Teste de Ligação a Membrana Perivitelina do Ovo de Galinha

1. Soluções de estoque de íons

a. Sulfato de gentamicina - 10 mg/mL:

50 mg / 5 mL

b. NaH_2PO_4 - 0,2 M:

0,239 g / 10 mL

c. MgCl_2 - 0,4 M:

0,3748 g / 10 mL

d. Piruvato de sódio - 20 mM:

0,022 g / 10 mL

OBS. Utilizar água SIGMA em todas as soluções.

2. Meio de Fertilização

a. Solução de Estoque - pH: 7,3-7,4:

50 mL de Água SIGMA

0,3331 g de NaCl

0,0115 g de KCl

100 μL de NaH_2PO_4

93 μL de Lactato de sódio

0,105 g de NaHCO_3

100 μL de Vermelho de fenol

0,0135 g de Cafeína

0,0147 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

64 μL de MgCl_2

0,1191 g de Hepes

b. Solução de Trabalho – pH: 7,4-7,8

10 ml de Água SIGMA

0,060 g de BSA

227 μL de Piruvato de Sódio

0,009 g de Glicose

100 μ L de Sulfato de gentamicina

4. Meio de Transporte de Ovários

500 mL de Solução fisiológica

0,02 g de Penicilina

5. Meio de Seleção dos oócitos

50 mL de Solução Fosfatada Tamponada Dulbecco

0,2 g de BSA

50 μ L de sulfato de gentamicina

ANEXO D - Preparo das Soluções das Sondas Fluorescentes

1.Solução de 6-carboxifluoresceína diacetato (C-FDA)

a.Solução de estoque:

2,3 mg de C-FDA

5 ml de DMSO (Dimetil sulfóxido)

b.Solução de trabalho:

C-FDA 20 µL

2.Solução de Iodeto de propídio (IP)

a.Solução de estoque:

2 mg de IP

4 ml de 0,9% NaCl

b.Solução de trabalho:

IP 10 µL

3.Solução de HOECHST 33358 – 10 µg/mL

a. Solução de Estoque:

5 mg / 5 mL de Água

b. Solução de Trabalho:

10 µL de HOECHST 33258

1,5 mL de meio de fertilização

ANEXO E – Resumos:

VII Congresso Norte Nordeste de Reprodução Animal – 28 a 30 de maio de 2014, Mossoró-RN

RECUPERAÇÃO OOCITÁRIA EM CATETOS (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) UTILIZANDO O MÉTODO DE FATIAMENTO OVARIANO – RESULTADOS PRELIMINARES

[Oocyte recovery in collared peccaries (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) by the ovarian slicing method - Preliminary results]

Dayse Ariane Soares Medeiros^{1*}, Livia Batista Campos¹, Alexandra Fernandes Pereira², Alexandre Rodrigues Silva¹

¹ Laboratório de Conservação e Germoplasma Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, Mossoró, RN, Brasil. *Autor para correspondência. E-mail: dayseariane@hotmail.com.

² Laboratório de Cultura Celular e Biotecnologia Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, Mossoró, RN, Brasil.

ABSTRACT: We aim to verify the efficiency of the slicing method for the oocytes retrieval from collared peccaries (*Pecari tajacu*) ovaries. Six ovaries derived from adult females were sliced on a Petri dish containing saline solution. Oocytes were collected, counted, and classified according to its viability. A total of 123 oocytes were obtained, being 41 per female on average. From that, a total of 109 were classified as viable presenting homogeneous cytoplasm and a well distributed number of Cumulus cells. In conclusion, slicing method can be efficiently used for oocyte retrieval in collared peccaries.

Keywords: *Tayassu tajacu*; ovarian slicing; oocyte.

Palavras-Chave: *Tayassu tajacu*; fatiamento ovariano; oócito.

INTRODUÇÃO

O cateto (*Pecari tajacu*) é um animal silvestre que se adapta facilmente em cativeiro, sendo indicado para ser utilizado na exploração comercial (Nogueira Filho et al., 1999). Porém, estudos acerca da sua biologia reprodutiva ainda são escassos, havendo a necessidade de pesquisas nesta área, a fim de otimizar sua produção (Mayer et al., 2006). Assim, destaca-se a necessidade do desenvolvimento de técnicas reprodutivas como a produção *in vitro* (PIV), cujo sucesso depende da utilização de oócitos de boa qualidade, sendo estes dependentes do método de recuperação adotado (Rodríguez et al., 2006). Dentre os métodos de recuperação oocitária, destaca-se o método de fatiamento ovariano (*slicing*) que possibilita o acesso a folículos localizados profundamente dentro do córtex do ovário, resultando na recuperação de grande quantidade de complexos cumulus-oócito (COCs), além de permitir trabalhar com ovários provenientes de abatedouros (Bernardi, 2005).

Diante do exposto, o presente trabalho objetivou determinar a taxa de recuperação de oócitos em catetos (*Pecari tajacu*), utilizando-se o método de fatiamento ovariano.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados seis ovários provenientes de três fêmeas de catetos (*Pecari tajacu*), abatidas devido o controle populacional que ocorre anualmente no Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CENAS) da UFERSA. Os ovários foram transportados ao laboratório em solução salina e lavados na mesma, a 37°C. Posteriormente, foram colocados numa placa de Petri e procedeu-se a coleta oocitária através do método de fatiamento ovariano (*slicing*) (Chaves et al., 2011). Após serem coletados, os oócitos foram submetidos a identificação e classificados (Graus I, II, III e IV) quanto ao grau de viabilidade de acordo com homogeneidade do citoplasma e o número de camadas de células do cumulus não expandidas, utilizando-se uma lupa estereoscópica, em aumento de 40x. Os resultados foram expressos em média e desvio padrão, utilizando o programa Microsoft Excel.

RESULTADOS

Foi possível obter um total de 123 oócitos pelo método de fatiamento ovariano (*slicing*), com uma média de 41 oócitos recuperados por animal. Dessas, um total de 109 oócitos foi considerado

visível, sendo 10 classificados como grau I, 36 como grau II, e 63 grau III (Tabela 1). Estes resultados demonstram a eficiência deste método, que se mostrou rápido e prático para a obtenção de

ócitos de boa qualidade. Pode-se concluir que a técnica de fatiamento ovariano (*slicing*) pode ser utilizada para a recuperação de ócitos em catetos (*Pecari tajacu*).

Tabela 1. Taxa de ócitos recuperados de fêmeas ($n=3$) de catetos (*Pecari tajacu*), determinada pelo método de fatiamento de ovários.

Animal	Classificação dos ócitos				TOTAL
	Grav I	Vitáveis Grav II	Grav III	Não vitáveis Grav IV	
01	0	5	6	6	17
02	7	15	22	4	48
03	3	16	35	4	58
Média $\pm$ DP	3,3 $\pm$ 2,1	12 $\pm$ 7,7	21 $\pm$ 14,5	4,6 $\pm$ 1,4	123

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bernardi M.L. Produção in vitro de embriões ovinos. *Acta Scientiarum Veterinariae*, v.33, p.1-16, 2005.
- Chaves R.M.; Bezerra, F.Q.G. ; Lima P.F.; Melo, M.C.; Lopes F.P.; Oliveira, M.A.L. Maturação nuclear in vitro e morte celular por apoptose em ócitos de caprinos nos períodos seco e chorvado. *Ciência Animal Brasileira*, v.12, p.593-601, 2011.
- Mayor, P.; Guimarães, D.A.; López-gatius, F.; López-béjar, M. First postpartum estrus and pregnancy in the female collared peccary (*Tayassu tajacu*) from the Amazon. *Theriogenology*, v.66, p.2001-2007, 2006.
- Nogueira-Eliz, S.L.G.; Cunha-e-sousa, S.S.; Takeuchi, S.A. Estrutura social de pecaria (*Mammalia, Tayassuidae*) em cativeiro. *Revista de Biologia*, v.1, p. 89-98, 1999.
- Rodríguez C, and L., alvarez M, and E, boixo JC, chamorro CA, par P. Ovarian pick-up in sheep: a comparison between different aspiration devices for optimal oocyte retrieval. *Reproduction in Domestic Animals*, v.41, p.106-113, 2006.

DETERMINAÇÃO DA TAXA DE RECUPERAÇÃO OOCITÁRIA EM CATETOS (*Pecari tajacu*, Linnaeus 1758) POR MEIO DA TÉCNICA DE FATIAMENTO OVARIANO

*Determination of oocyte recovery in collared peccaries (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) by the ovarian slicing method*

Dayse Ariane Soares Medeiros^{1*}, Livia Batista Campos¹, Alexsandra Fernandes Pereira², Alexandre Rodrigues Silva^{4}**

¹Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal, Departamento de Ciências Animais – UFERSA

*Estudante IC PICI, **Orientador. E-mail: dayseariane@hotmail.com

O cateto (*Pecari tajacu*) é um animal silvestre que se adapta facilmente as mais diversas condições climáticas, em associação, essa espécie apresenta grande apreciação de sua carne e pele no mercado internacional. Com isso criatórios comerciais têm surgido no intuito de atender essa demanda. Para tanto, conhecimentos da fisiologia reprodutiva se torna indispensável para o aprimoramento de biotécnicas reprodutivas, melhorando assim, sua aplicabilidade. Assim, o presente trabalho objetivou determinar a taxa de recuperação de oócitos de catetos a partir do método de fatiamento ovariano. Para a realização do experimento foram utilizados seis ovários provenientes de três fêmeas catetos fêmeas, adultas e híginas, oriundas do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA). As fêmeas eram provenientes de grupo de excedente populacional do CEMAS, cujo grupo foi selecionado para o abate, seguindo o protocolo sugerido pelo Comitê de ética desta mesma universidade. Após a dissecação dos ovários, os mesmos foram envoltos por gazes embebidas em solução salina, previamente aquecidas a uma temperatura de 37°C. Em seguida foram colocados em Placa de Petri, onde procedeu-se a coleta oocitária através do método de fatiamento ovariano, que consiste no seccionamento dos ovários em finas fatias com lâminas de bisturi, para a liberação dos complexos cumulus oophorus (COCs). Após a coleta, com auxílio de lupa estereomicroscópica em aumento de 40x, os oócitos foram identificados e classificados quanto ao grau de homogeneidade do citoplasma e número de camadas das células do cúmulus não expandidas sendo obtidos 123 oócitos colhidos através do método de fatiamento ovariano. Os resultados observados, mostraram média de 41 oócitos recuperados por animal. Desses, um total de 109 (88,61%) oócitos foram considerados viáveis, dos quais 3,3±2,1 (8,1%) oócitos foram classificados como grau I, 12±7,7 (29,2%) como grau II, e 21±14,5 (51,2%) como grau III, em média. Através dos resultados obtidos, pode-se concluir a praticidade da técnica de fatiamento ovariano para a obtenção de oócitos viáveis de boa qualidade, sendo então considerada uma técnica útil para a recuperação oocitária de catetos fêmeas.

Palavras-chave: *Tayassu tajacu*; Ovário; Fatiamento; Oócito.

Keywords: *Tayassu tajacu* ;Ovarian; Slicing; Oocyte.

Apoio: Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica - UFERSA