

MÉTODOS PARA ESTOCAGEM DOS ESPERMATOZOIDES DO EPIDIDÍMO DE GARANHÕES

Julia Quental Caribé, Marcilio Nichi, Álvaro de Miranda Alves, Giulia Kiyomi Venchiato Kawai

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/ USP

e-mail: julia.caribe@usp.br

Objetivos

Este estudo tem como objetivo comparar a qualidade pós-descongelamento de espermatozoides epididimários armazenados a 5°C, durante 24 horas, *in vivo* (i. e. no próprio complexo testículo-epidídimo) ou *in vitro* (i. e. em diluidor a base de leite desnatado disponível comercialmente).

Métodos e Procedimentos

Foram coletados complexos testículo-epidídimo de 10 animais (20 testículos) de orquiectomias eletivas. Os complexos de cada animal foram mantidos em isopor com gelo até a chegada ao laboratório, onde foram designados aleatoriamente em grupos Diluidor e Testículo. O complexo testículo-epidídimo do grupo Diluidor foi coletado em até 2 horas após a orquiectomia, diluídos em diluidor comercial BotuSêmen® e submetidos a refrigeração (5°C) por 24 horas. Complexos provenientes do grupo Testículo foram submetidos a refrigeração (5°C) por 24 horas e depois a colheita de espermatozoides. Posteriormente, as amostras que possuíram motilidade superior a 40% foram criopreservadas.

Foi realizada análise da cinética espermática (CASA) logo após a coleta (fresco), e após a refrigeração tanto no diluidor como no testículo. Após no mínimo 1 semana foi feito o descongelamento e foram avaliadas a cinética espermática, a integridade de membrana plasmática e acrossomal (eosina-nigrosina e fast green/rosa bengala, respectivamente), a atividade mitocondrial (3'3 Diaminobenzina – Teste DAB) e a suscetibilidade dos

espermatozoides a peroxidação lipídica (Ensaio TBARS).

Resultados

Nas amostras criopreservadas, não houve diferença entre os grupos quanto a cinética espermática, integridade de membrana plasmática e acrossomal. No entanto, houve uma maior porcentagem de células com alto comprometimento mitocondrial (DAB III) e uma maior susceptibilidade à peroxidação lipídica (TBARS) no grupo que ficou refrigerado no testículo. Na análise do sêmen fresco e pré-congelamento, verificou-se uma menor amplitude de movimento lateral da cabeça e uma maior porcentagem de espermatozoides lentos nas amostras epididimárias imediatamente após a coleta em relação aos refrigerados no testículo por 24 horas. Houve uma maior frequência de batimento cruzado e uma maior porcentagem de células estáticas nas amostras resfriadas no testículo em relação às amostras frescas e às resfriadas no diluidor.

Conclusões

Foi possível observar que houve uma diminuição da qualidade nos espermatozoides que ficaram refrigerados no complexo testículo-epidídimo em relação a aqueles que ficaram no diluidor comercial BotuSêmen®. Com isso concluímos que em casos que o animal precise passar por uma orquiectomia ou em casos de óbito, a coleta dos espermatozoides epididimários deve ser feita o mais rápido possível para garantir melhor qualidade e índices reprodutivos.

Referências Bibliográficas

- BARKER, C A; GANDIER, J C. Pregnancy In A Mare Resulting From Frozen Epididymal Spermatozoa. *Canadian journal of comparative medicine and veterinary science*, v. 21, n. 2, p. 47–51, 1957.
- BRUEMMER, J. E. *et al.* Effect of storage at 5°C on the motility and cryopreservation of stallion epididymal spermatozoa. *Theriogenology*, v. 58, n. 2–4, p. 405–407, 2002.
- FALOMO, Maria Elena; ROSSI, Melissa; MANTOVANI, Roberto. Collection, storage and freezability of equine epididymal spermatozoa. *Italian Journal of Animal Science*, v. 15, n. 3, p. 386–389, 2016.
- GARDE, J *et al.* Physiological Characteristics of Epididymal Spermatozoa. *Theriogenology*, v. 3, p. 1994, 1994.
- JAMES, A N *et al.* Preservation of equine sperm stored in the epididymis at 4 8C for 24, 48, 72 and 96 hours. *Theriogenology* 58, v. 58, p. 401–404, 2002.
- MELO, C.M. *et al.* Comparison of three different extenders for freezing epididymal stallion sperm. *Animal Reproduction Science*, v. 107, n. 3–4, p. 331, 2008.
- MONTEIRO, G. A. *et al.* Cooling of ejaculated and epididymal stallion sperm. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 65, n. 3, p. 681–686, 2013.
- MONTEIRO, Gabriel Augusto *et al.* Effect of Storage Time and Temperature of Equine Epididymis on the Viability, Motion Parameters, and Freezability of Epididymal Sperm. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 33, n. 3, p. 169–173, 2013.
- NICHI, Marcilio. Efeito do tratamento com antioxidantes e ácidos graxos poli-insaturados em amostras espermáticas epididimárias de touros. p. 120, 2009.
- STAWICKI, R. J. *et al.* Pregnancy outcomes using stallion epididymal sperm stored at 5 °C for 24 or 48 hours before harvest. *Theriogenology*, v. 85, n. 4, p. 698–702, 2016.
- VIEIRA, L. A. *et al.* Equine spermatozoa stored in the epididymis for up to 96h at 4°C can be successfully cryopreserved and maintain their fertilization capacity. *Animal Reproduction Science*, v. 136, n. 4, p. 280–288, 2013.
- BERGSTEIN-GALAN, Tácia Gomes *et al.* Espermatozoides epididimários: refrigeração e criopreservação. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 41, n. 3, p. 659–664, 2017.
- GRANEMANN, L.C. *et al.* Número Total De Espermatozóides De Garanhões Obtidos Através Da Colheita Com Vagina Artificial E Por Fluxo Retrógrado Da Cauda Do Epidídimo. *Archives of Veterinary Science*, v. 11, n. 1, p. 73–77, 2006.

METHODS OF COLD STORAGE FOR STALLION EPIDIDYMAL SPERM

Julia Quental Caribé, Marcilio Nichi, Álvaro de Miranda Alves, Giulia Kiyomi Vechiato Kawai

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/ USP

e-mail: julia.caribe@usp.br

Objectives

The objective of this study was to compare post-thaw quality of stallion epididymal sperm stored at 5°C for 24 hours, *in vivo* (*i. e.* inside the testis-epididymis complex) or *in vitro* (*i. e.* in skimmed milk-based extender commercially available).

Materials and Methods

Testis-epididymis complexes were collected from 10 animals (20 testicles) from elective orchiectomies. Both complexes of each animal were kept in ice until arrival at the laboratory, where they were randomly assigned to Extender and Testicle groups. The testis-epididymal complex on group Extender was collected within 2 hours after orchiectomy, diluted in commercial extender BotuSêmen® and refrigerated (5°C) for 24 hours. Complexes from Testicle group were submitted to refrigeration (5°C) for 24 hours and then to the sperm collection. Subsequently, samples that had motility greater than 40% were cryopreserved. CASA sperm kinetics analysis was performed immediately after collection (fresh), and in samples refrigerated both in the extender and in the testicle. After at least one week, thawing was performed and the sperm kinetics, integrity of plasmatic and acrosomal membranes (eosin-nigrosine and fast green/ Bengal rose, respectively), mitochondrial activity (3'3 Diaminobenzine – DAB Test) and spermatozoa susceptibility to lipid peroxidation (TBARS assay) were evaluated.

Results

In the cryopreserved samples, there was no difference between groups regarding spermatozoa kinetics, plasma and acrosomal membrane integrity. However, there was a higher number of cells with serious mitochondrial alterations (DAB III) and increased susceptibility to lipid peroxidation (TBARS) in the Testicle group. When comparing the kinetics of fresh and the refrigerated samples (both pre-cryopreservation), we observed increased amplitude of head lateral movement and higher percentages of slow sperm in the fresh sperm than those refrigerated in the testicle for 24 hours. There was also a higher cross-beating frequency in samples refrigerated in the testicle when compared to the commercial extender. Also, a higher percentage of static sperm was observed in samples refrigerated in the testicle when compared to both fresh and refrigerated in the commercial extender.

Conclusions

It was possible to observe that there was a decrease in spermatozoa quality in samples that were refrigerated in the testis-epididymal complex compared with those refrigerated in commercial extender BotuSêmen®. We concluded that in cases that the animal needs an orchiectomy or in cases of death, the epididymal sperm collection must be performed as quickly as possible to assure better quality and reproductive rates.

References

BARKER, C A; GANDIER, J C.

Pregnancy In A Mare Resulting From Frozen Epididymal Spermatozoa. *Canadian journal of comparative medicine and veterinary science*, v. 21, n. 2, p. 47–51, 1957.

BRUEMMER, J. E. *et al.* Effect of storage at 5°C on the motility and cryopreservation of stallion epididymal spermatozoa. *Theriogenology*, v. 58, n. 2–4, p. 405–407, 2002.

FALOMO, Maria Elena; ROSSI, Melissa; MANTOVANI, Roberto. Collection, storage and freezability of equine epididymal spermatozoa. *Italian Journal of Animal Science*, v. 15, n. 3, p. 386–389, 2016.

GARDE, J *et al.* Physiological Characteristics of Epididymal Spermatozoa. *Theriogenology*, v. 3, p. 1994, 1994.

JAMES, A N *et al.* Preservation of equine sperm stored in the epididymis at 4 °C for 24, 48, 72 and 96 hours. *Theriogenology* 58, v. 58, p. 401–404, 2002.

MELO, C.M. *et al.* Comparison of three different extenders for freezing epididymal stallion sperm. *Animal Reproduction Science*, v. 107, n. 3–4, p. 331, 2008.

MONTEIRO, G. A. *et al.* Cooling of ejaculated and epididymal stallion sperm. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 65, n. 3, p. 681–686, 2013.

MONTEIRO, Gabriel Augusto *et al.* Effect of Storage Time and Temperature of Equine Epididymis on the Viability, Motion Parameters, and Freezability of Epididymal Sperm. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 33, n. 3, p. 169–173, 2013.

NICHI, Marcilio. Efeito do tratamento

com antioxidantes e ácidos graxos poli-insaturados em amostras espermáticas epididimárias de touros. p. 120, 2009.

STAWICKI, R. J. *et al.* Pregnancy outcomes using stallion epididymal sperm stored at 5 °C for 24 or 48 hours before harvest. *Theriogenology*, v. 85, n. 4, p. 698–702, 2016.

VIEIRA, L. A. *et al.* Equine spermatozoa stored in the epididymis for up to 96h at 4°C can be successfully cryopreserved and maintain their fertilization capacity. *Animal Reproduction Science*, v. 136, n. 4, p. 280–288, 2013.

BERGSTEIN-GALAN, Tácia Gomes *et al.* Espermatozoides epididimários: refrigeração e criopreservação. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 41, n. 3, p. 659–664, 2017.

GRANEMANN, L.C. *et al.* Número Total De Espermatozoides De Garanhões Obtidos Através Da Colheita Com Vagina Artificial E Por Fluxo Retrógrado Da Cauda Do Epidídimo. *Archives of Veterinary Science*, v. 11, n. 1, p. 73–77, 2006.