

## Métodos para estocagem dos espermatozoides do epididímo de garanhões

**Julia Quental Caribé<sup>1</sup>, Thawan Santana Piemonte<sup>1</sup>, Ken Kawaoka Nagai<sup>1</sup>, Raphaela Gabrielle Brito Sousa<sup>1</sup>, Henrique Thomazo Frias<sup>1</sup>, Álvaro de Miranda Alves<sup>1</sup>, Marcilio Nichi<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup> Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo

\*e-mail: mnichi@usp.br

Atualmente, são empregados numerosos processos biotecnológicos com o intuito de preservar e maximizar o material genético de um animal. A colheita de espermatozoides epididimários tem sido uma alternativa em situações onde o animal vem a óbito ou após a orquiectomia. Entretanto, essa prática exige, além de conhecimentos de manipulação, cuidados para a obtenção do epididímo e o correto armazenamento. O tempo de recuperação desses espermatozoides influencia diretamente na qualidade destas células, refletida na cinética espermática, integridade de membrana plasmática e acrosomal, atividade mitocondrial e suscetibilidade à peroxidação lipídica. Diante disso, foram coletados complexos testículo-epididímo de 10 animais (totalizando 20 testículos) de orquiectomias eletivas visando comparar a qualidade pós-descongelamento de espermatozoides epididimários armazenados a 5°C durante 24 horas, *in vivo* (ou seja, no próprio complexo testículo-epididímo) ou *in vitro* (ou seja, em diluidor à base de leite desnaturado comercialmente). 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-epididímo do grupo Diluidor foi coletado em até 2 horas após a orquiectomia, diluído em diluidor comercial BotuSêmen® e submetido à refrigeração a 5°C por 24 horas, seguido pela 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 quanto no testículo. Após no mínimo 1 semana, foi feito o descongelamento e foram avaliadas a cinética espermática, a integridade de membrana plasmática e acrosomal (eosina-nigrosina e fast green/rosa bengala, respectivamente), a atividade mitocondrial (3'3 Diaminobenzina – Teste DAB) e a suscetibilidade dos espermatozoides à peroxidação lipídica (ensaio TBARS). Os dados foram analisados utilizando o software estatístico SAS *System for Windows*, desenvolvido pela SAS Institute Inc. de Cary, Carolina do Norte, Estados Unidos. O nível de significância adotado foi de 5% ( $p < 0,05$ ), indicando que diferenças consideradas estatisticamente significativas seriam aquelas em que a probabilidade de ocorrência ao acaso fosse menor que 5%. A análise descritiva incluiu o cálculo das médias, bem como a avaliação da variabilidade em torno dessas médias por meio do erro padrão, que representa a variação esperada das médias em diferentes amostragens da mesma população. Foi possível obter testículos de 10 cavalos (totalizando 20 testículos), sendo que apenas 3 cavalos apresentaram espermatozoides epididimários com qualidade mínima de 40% de motilidade para serem congelados após as 24 horas de refrigeração ( $p < 0,05$ ). No entanto, houve uma maior porcentagem de células com alto comprometimento mitocondrial (DAB III) e uma maior suscetibilidade à peroxidação lipídica (TBARS) no grupo que ficou refrigerado no testículo ( $p < 0,05$ ). 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 refrigeradas no testículo ( $62.8 \pm 3.3^a$ ) em relação às amostras frescas ( $42.2 \pm 4.9^b$ ) e às refrigeradas no diluidor ( $47.1 \pm 4.5^b$ ). O presente estudo demonstrou que os espermatozoides armazenados no complexo testículo-epididímo tiveram uma piora em alguns parâmetros em relação àqueles armazenados em diluidor comercial pelo mesmo período. Havendo a necessidade de refrigeração dos espermatozoides epididimários antes de seu uso, é interessante que sejam coletados e armazenados em diluidor comercial, para preservar seus parâmetros por um tempo maior, garantindo melhores índices reprodutivos quando utilizados. Os resultados sugerem que houve uma diminuição da qualidade nos espermatozoides que ficaram refrigerados no complexo testículo-epididímo em relação àqueles que ficaram no diluidor comercial BotuSêmen®. Com isso, concluímos que, em casos em 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.

**Palavras-chave:** cinética espermática. complexo testículo-epididímo. diluidor. equus caballus. peroxidação lipídica.

## Methods for storing sperm from the epididymis of stallions

**Julia Quental Caribé<sup>1</sup>, Thawan Santana Piemonte<sup>1</sup>, Ken Kawaoka Nagai<sup>1</sup>, Raphaela Gabrielle Brito Sousa<sup>1</sup>, Henrique Thomazo Frias<sup>1</sup>, Álvaro de Miranda Alves<sup>1</sup>, Marcilio Nichi<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup> Department of Animal Reproduction, Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny, University of São Paulo  
 \*e-mail: mnichi@usp.br

Currently, numerous biotechnological processes are used with the aim of preserving and maximizing the genetic material of an animal. The harvesting of epididymal sperm has been an alternative in situations where the animal dies or post-orchietomy. However, in addition to manipulation knowledge, it requires care for obtaining the epididymis and correct storage; the recovery time of these sperm directly influences the quality of these cells, such as sperm kinetics, plasma membrane and acrosome integrity, mitochondrial activity, and susceptibility to lipid peroxidation. Therefore, testicle-epididymis complexes were collected from 10 animals (20 testicles) undergoing elective orchietomies to compare the post-thaw quality of epididymal sperm stored at 5°C for 24 hours, *in vivo* (i.e., in the testicle-epididymis complex itself) or *in vitro* (i.e., in commercially available skim milk-based diluent). The complexes of each animal were kept in Styrofoam with ice until arrival at the laboratory, where they were randomly assigned to Dilutor and Testicle groups. The testicle-epididymis complex from the Dilutor group was collected within 2 hours after orchietomy, diluted in BotuSêmen® commercial diluent, and refrigerated at 5°C for 24 hours, followed by sperm harvesting. Subsequently, samples with motility greater than 40% were cryopreserved. Sperm kinetics analysis (CASA) was performed immediately after collection (fresh) and after refrigeration in both diluent and testicle. After a minimum of 1 week, thawing was performed, and sperm kinetics, plasma membrane and acrosomal integrity (eosin-nigrosin and fast green/roa bengal, respectively), mitochondrial activity (3'3 Diaminobenzidine - DAB Test), and sperm susceptibility to lipid peroxidation (TBARS assay) were evaluated. The data were analyzed using the statistical software SAS System for Windows, developed by SAS Institute Inc. from Cary, North Carolina, USA. The significance level adopted was 5% ( $p < 0.05$ ), indicating that statistically significant differences were those in which the probability of random occurrence was less than 5%. Descriptive analysis included calculating means and evaluating variability around these means through standard error, representing the expected variation of means in different samples from the same population. It was possible to obtain testicles from 10 horses (20 testicles in total), of which only 3 horses had epididymal sperm with a minimum quality of 40% motility to be frozen after 24 hours of refrigeration ( $p < 0.05$ ). However, there was a higher percentage of cells with high mitochondrial compromise (DAB III) and greater susceptibility to lipid peroxidation (TBARS) in the group refrigerated in the testicle ( $p < 0.05$ ). In the analysis of fresh semen and pre-freezing, a smaller lateral head movement amplitude and a higher percentage of slow sperm were observed in epididymal samples immediately after collection compared to those refrigerated in the testicle for 24 hours. There was a higher frequency of cross-beating and a higher percentage of static cells in samples refrigerated in the testicle ( $62.8 \pm 3.3^a$ ) compared to fresh samples ( $42.2 \pm 4.9^b$ ) and those refrigerated in the diluent ( $47.1 \pm 4.5^b$ ). This study showed that sperm stored in the testicle-epididymis complex worsened in some parameters compared to those stored in commercial diluent for the same period. If refrigeration of epididymal sperm before use is necessary, it is interesting to collect and store them in commercial diluent to preserve their parameters for a longer time, ensuring better reproductive indices when used. The results suggest a decrease in quality in sperm refrigerated in the testicle-epididymis complex compared to those in the commercial BotuSêmen® diluent. Therefore, we conclude that in cases where the animal needs to undergo an orchietomy or in cases of death, the collection of epididymal sperm should be done as quickly as possible to ensure better quality and reproductive indices.

**Keywords:** diluent. equus caballus. lipid peroxidation. sperm kinetics. testis-epididymis complex.