

MÉTODOS PARA ESTOCAGEM DOS ESPERMATOZOIDES DO EPIDÍDIMO DE TOUROS

Luis Varela Brasileiro de Alcantara

Ken Kawaoka Nagai

Álvaro de Miranda Alves

Orientador: Prof. Dr. Marcilio Nichi

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade de São Paulo

luis.alcantara@usp.br

Objetivos

O objetivo deste estudo foi comparar métodos para estocagem de espermatozoides epididimários de touros, através da análise da qualidade pós-descongelamento de espermatozoides armazenados a 4°C, durante 24 horas, in vivo (armazenado no complexo testículo-epidídimo) versus in vitro (armazenado no diluidor utilizando a técnica two steps)

Métodos e Procedimentos

Foram utilizados 4 pares de testículo de touro, provenientes de abatedouro. Os testículos foram distribuídos aleatoriamente nos tratamentos.

Os tratamentos usados, para refrigeração dos espermatozoides, foram: armazenamento, por 24 horas a 4°C, em fração A de diluidor próprio de tri-gema (Grupo 1); e armazenamento no complexo testículo-epidídimo por 24 horas a 4°C (Grupo 2).

As amostras foram analisadas, pré refrigeração, para concentração e para motilidade pelo CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) e só foram aceitas amostras com no mínimo 40% de motilidade.

Os espermatozoides, foram coletados da cauda do epidídimo, por fluxo retrogrado como feito por NICHII et al., 2006.

Após a refrigeração, as amostras do grupo 2 foram coletadas e ambos os grupos foram criopreservados.

Após uma semana, no mínimo, as amostras foram descongeladas e analisadas para: integridade da membrana plasmática (método eosina-nigrosina); suscetibilidade do espermatozoide ao estresse oxidativo (Ensaio TBARS); análise computadorizada da motilidade (CASA); e avaliação da funcionalidade mitocondrial (método DAB) como feito por NICHII et al., 2006.

Os dados foram analisados pelo programa SAS System for Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC, E.U.A.), com um nível de significância de 5% ($p < 0,05$). A análise descritiva foi realizada utilizando as médias e erros padrão.

Resultados

Não houve diferença entre os tratamentos para DAB, TBARS e eosina/nigrosina ($P > 0,05$). Porém, houve uma diferença na motilidade, nos parâmetros específicos de motilidade total ($P = 0,01$), motilidade progressiva ($P = 0,02$), motilidade rápida ($P = 0,01$), motilidade média ($P = 0,01$), onde o grupo 1 foi superior e houve

alteração na motilidade estática ($P=0,01$), onde o grupo 2 teve um valor superior.

Conclusões

O presente estudo mostrou que os espermatozoides coletados da cauda do epidídimo, armazenados em diluidor, possuem parâmetros superiores, pós criopreservação do que os armazenados no complexo testículo-epidídimo

Referências

Nichi, M., Goovaerts, I. G. F., Cortada, C. N. M., Barnabe, V. H., De Clercq, J. B. P., & Bols, P. E. J. (2007). Roles of lipid peroxidation and cytoplasmic droplets on in vitro fertilization capacity of sperm collected from bovine epididymides stored at 4 and 34 C. *Theriogenology*, 67(2), 334-340

NICHI, Marcilio. Efeito do tratamento com antioxidantes e ácidos graxos poli-insaturados em amostras espermáticas epididimárias de touros. p. 120, 2009.

METHODS FOR STORAGE OF BULL EPIDIDYMAL SPERMATOZOA

Luis Varela Brasileiro de Alcantara

**Ken Kawaoka Nagai
Álvaro de Miranda Alves**

Supervisor Prof. Dr. Marcilio Nichi

Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science - University of São Paulo

luis.alcantara@usp.br

Objectives

The objective of this study was to compare methods for storing epididymal spermatozoa from bulls, through the analysis of post-thaw quality of spermatozoa stored at 4°C for 24 hours, in vivo (stored in the testis-epididymis complex) versus in vitro (stored in extender using the two steps technique).

Materials and Methods

Four pairs of bull testes from an abattoir were used. The testes were randomly distributed between the treatments.

The refrigeration storage treatments used for the spermatozoa were: storage for 24 hours at 4°C in fraction A of a tris-extender (Group 1); and storage in the testis-epididymis complex for 24 hours at 4°C (Group 2).

The samples were analyzed pre-refrigeration for concentration and motility using CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) and only samples with a minimum of 40% motility were accepted.

The spermatozoa were collected from the epididymis tail using retrograde flow as done by NICHÍ et al., 2006.

After refrigeration, the samples from group 2 were collected and both groups were cryopreserved.

After at least one week, the samples were thawed and analyzed for: plasma membrane integrity (eosin-nigrosin method); sperm susceptibility to oxidative stress (TBARS Assay); computerized motility analysis (CASA); and assessment of mitochondrial functionality (DAB method) as done by NICHÍ et al., 2006.

The data were analyzed using the SAS System for Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) statistical software, with a significance level of 5% ($p < 0.05$). Descriptive analysis was performed using means and standard errors.

Results

There was no difference between the treatments for DAB, TBARS and eosin/nigrosin ($P > 0.05$). However, there was a difference in motility, in the specific motility parameters of total motility ($P = 0.01$), progressive motility ($P = 0.02$), rapid motility ($P = 0.01$), medium motility ($P = 0.01$), where Group 1 was superior and there was an alteration in static motility ($P = 0.01$), where Group 2 had a higher value.

Conclusions

This study showed that spermatozoa collected from the epididymis tail, stored in extender, have superior parameters after cryopreservation compared to those stored in the testis-epididymis complex.

.

References

Nichi, M., Goovaerts, I. G. F., Cortada, C. N. M., Barnabe, V. H., De Clercq, J. B. P., & Bols, P. E. J. (2007). Roles of lipid peroxidation and cytoplasmic droplets on in vitro fertilization capacity of sperm collected from bovine epididymides stored at 4 and 34 C. *Theriogenology*, 67(2), 334-340

NICHI, Marcilio. Efeito do tratamento com antioxidantes e ácidos graxos poli-insaturados em amostras espermáticas epididimárias de touros. p. 120, 2009