

Métodos para estocagem dos espermatozoides do epidídimo de touros

Luis Varela Brasileiro de Alcantara^{1*}, Ken Kawaoka Nagai¹, Álvaro de Miranda Alves¹, Raphaela Gabrielle Brito Sousa¹, Henrique Thomazo Frias¹, Roberta Ferreira Leite¹, Átila Adão da Rocha Albuquerque¹, Marcilio Nichi¹

¹Laboratório de Andrologia - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, São Paulo, Brasil

*e-mail: luis.alcantara@usp.br

O uso de sêmen de touros de alto valor genético é de fundamental importância para o desenvolvimento da pecuária bovina no Brasil, porém estes animais estão sujeitos a diversas fatalidades, acarretando em graves perdas econômicas e genéticas. O uso de espermatozoides provenientes da cauda do epidídimo vem sendo estudado em diversas espécies, pois possibilita a coleta de animais de alto valor genético, mesmo após o óbito. Entretanto, o armazenamento para o transporte continua sendo uma problemática para esta técnica em touros, devido ao distanciamento dos grandes centros urbanos ou a morte inesperada de um indivíduo pode comprometer a qualidade do material até o seu destino final para colheita e criopreservação. Assim, uma alternativa para o armazenamento durante o transporte poderia ser a colheita imediata, seguida de transporte do sêmen refrigerado para um laboratório capacitado. Dessa forma, foi proposto comparar métodos para estocagem de espermatozoides recuperados do epidídimo de testículos de touros provenientes de abatedouro, através da análise da qualidade pós-descongelamento de espermatozoides armazenados a 4°C durante 24 horas no próprio testículo versus armazenados em diluidor. 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 (sem glicerol) de tris-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 utilizadas amostras com no mínimo 40% de motilidade. Os espermatozoides foram coletados da cauda do epidídimo através da técnica do fluxo retrogrado. 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). 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 mais ou menos o erro padrão. Não houve diferença entre os tratamentos para DAB, TBARS e eosina/nigrosina ($P > 0,05$). Porém, houve diferença 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 também alteração na proporção de espermatozoides estáticos ($P = 0,01$), onde o grupo 2 teve um valor superior. 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.

Palavras-chave: Epidídimo, criopreservação de sêmen, bovinos.

Methods for storage of bull epididymal spermatozoa

Luis Varela Brasileiro de Alcantara^{1*}, Ken Kawaoka Nagai¹, Álvaro de Miranda Alves¹, Raphaela Gabrielle Brito Sousa¹, Henrique Thomazo Frias¹, Roberta Ferreira Leite¹, Átila Adão da Rocha Albuquerque¹, Marcilio Nichi¹

¹Laboratório de Andrologia - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, São Paulo, Brasil

*e-mail: luis.alcantara@usp.br

The use of semen from bulls with high genetic value is of fundamental importance for the development of cattle farming in Brazil. However, these animals are subject to various fatalities, resulting in significant economic and genetic losses. The use of spermatozoa from the epididymal tail has been studied in various species as it allows for the collection of animals with high genetic value even after death. However, transportation storage remains problematic for this technique in bulls due to the distance from major urban centers or the unexpected death of an individual, which can compromise the quality of the material until its final destination for collection and cryopreservation. Therefore, an alternative for storage during transportation could be immediate collection followed by transportation of the refrigerated semen to a qualified laboratory. Thus, this study aimed to compare methods for storing spermatozoa recovered from the epididymis of bull testicles from slaughterhouses by analyzing the post-thaw quality of sperm stored at 4°C for 24 hours in the testicle itself versus stored in a diluent. Four pairs of bull testicles from slaughterhouses were used, randomly distributed across treatments. The treatments used for sperm refrigeration were: storage for 24 hours at 4°C in fraction A (without glycerol) of tris-yolk (Group 1); and storage in the testis-epididymis complex for 24 hours at 4°C (Group 2). Samples were analyzed pre-refrigeration for concentration and motility using Computer Assisted Sperm Analysis (CASA), and only samples with a minimum of 40% motility were used. Spermatozoa were collected from the epididymal tail using the retrograde flow technique. After refrigeration, samples from Group 2 were collected, and both groups were cryopreserved. After at least one week, samples were thawed and analyzed for: plasma membrane integrity (eosin-nigrosin method); sperm susceptibility to oxidative stress (TBARS assay); computerized motility analysis (CASA); and evaluation of mitochondrial functionality (DAB method). Data were analyzed using the SAS System for Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), with a significance level of 5% ($p < 0.05$). Descriptive analysis was performed using means plus or minus the standard error. There was no difference between treatments for DAB, TBARS, and eosin/nigrosin ($P > 0.05$). However, there were differences in specific parameters of total motility ($P=0.01$), progressive motility ($P=0.02$), rapid motility ($P=0.01$), and medium motility ($P=0.01$), where Group 1 was superior, and there was also a change in the proportion of static spermatozoa ($P=0.01$), where Group 2 had a higher value. This study showed that sperm collected from the epididymal tail and stored in a diluent had superior post-cryopreservation parameters compared to those stored in the testis-epididymis complex.

Keywords: Epididymis, semen cryopreservation, cattle.