

Foto: Gustavo Porpino



Recuperação e Criopreservação de Espermatozóides do Epidídimo de Bovinos Mortos para Uso na Inseminação Artificial ou na Fecundação in vitro

Carlos Frederico Martins¹

Margot Nunes Dode²

José Robson Bezerra Sereno³

Priscila de Melo Costa⁴

Moacir Gabriel Saueressig⁵

Rodofo Rumpf⁶

Introdução

Material genético tanto de animais de interesse econômico como de animais silvestres pode ser perdido a qualquer momento por morte animal não explicada. Nesse caso, esforços podem ser realizados por meio da utilização das técnicas de reprodução assistida para evitar a perda total desse material genético de importância (MARTINS et al., 2007).

A recuperação e a criopreservação de espermatozóides do epidídimo de animais mortos (recuperação pós-morte) é uma opção viável para preservar gametas masculinos e dessa forma manter um banco de germoplasma (TITTARELLI et al., 2006). Porém, há pouco tempo, após a morte animal, para que se possa recuperar espermatozóides funcionais antes do processo de decomposição. A determinação da janela de oportunidade entre a

morte e a perda da funcionalidade dos seus gametas é de fundamental importância para se resgatar e preservar espermatozóides do epidídimo.

Atualmente, o interesse em preservar espécies em perigo de extinção tem aumentado a quantidade de pesquisas para recuperar espermatozóides funcionais do epidídimo de machos mortos (FOOTE, 2000). No entanto, esse procedimento também pode ser bem aplicado para animais domésticos (bovinos, caninos, caprinos, eqüinos, felinos, ovinos e suínos) de valor econômico e sentimental para seus proprietários.

Em muitas ocasiões, a única opção para salvar os gametas é por meio do transporte do testículo e epidídimo para um laboratório equipado para o processamento dos espermatozóides. As condições (tempo, temperatura e ambiente) sobre as quais o epidídimo é manipulado podem causar importantes mudanças na viabilidade dos espermatozóides.

¹Médico Veterinário, D.Sc., Pesquisador da Embrapa Cerrados, carlos.frederico@cpac.embrapa.br

²Médica Veterinária, Ph.D., Pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqB W5 Norte Final, CEP 70770-900-Brasília, DF, margot@cenargen.embrapa.br

³Médico Veterinário, Ph.D., Pesquisador da Embrapa Cerrados, sereno@cpac.embrapa.br

⁴Bióloga, Bolsista do CNPq, rnwpp@yahoo.com.br

⁵Médico Veterinário, M.Sc., Pesquisador da Embrapa Cerrados, moacir@cpac.embrapa.br

⁶Médico Veterinário, Ph.D., Pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, rodofo@cenargen.embrapa.br

Assim, este documento tem por objetivo apresentar o procedimento prático de recuperação de espermatozóides do epidídimo de bovinos e congelamento espermática para formação de um banco genético, quando os animais são encontrados mortos. Além disso, sugerir opções de utilização desse material preservado por meio da inseminação artificial ou fecundação in vitro.

Coleta e Transporte dos Testículos ao Laboratório

Após a identificação da morte do reprodutor, os testículos devem ser retirados rapidamente por meio de corte com bisturi ou uma faca limpa higienizada com álcool. O corte deve ser realizado na porção em que a bolsa escrotal entra em contato com o abdômen (pescoço do testículo, Fig. 1). Todo conjunto (bolsa escrotal com os testículos) deve ser colocado em uma caixa de isopor para o transporte até o laboratório. Caso o laboratório seja localizado longe da propriedade, é necessário colocar gelo comum ou gelo seco em um dos lados da caixa para manter o local resfriado (fazer uma barreira com um pedaço de isopor para evitar que o gelo entre em contato com os testículos).

Foto: Carlos Frederico Martins

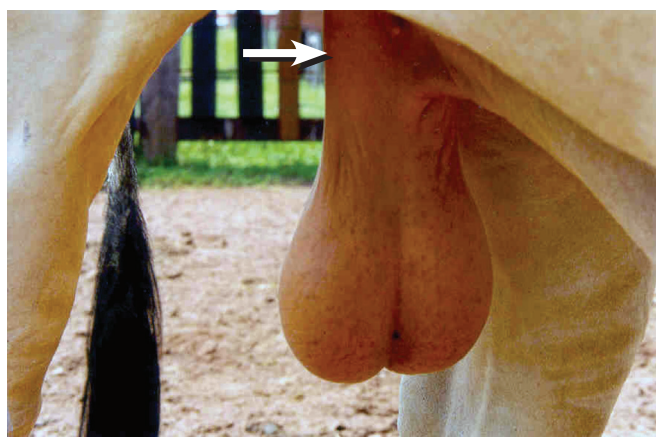


Fig. 1. Local de incisão para retirada dos testículos dos animais mortos.

Formas de se Recuperar Espermatozóides do Epidídimo

Para extração, os espermatozóides da cauda do epidídimo e da região proximal do ducto deferente podem ser isolados de duas formas: (1) por fluxo gerado pela injeção de meio de congelamento no canal deferente em direção ao epidídimo; (2) por cortes na região do corpo do epidídimo ou dissecação, seguida de cortes e pressão manual na região

da cauda do epidídimo (HEWITT et al., 2001; MARTINEZ-PASTOR et al, 2005; MARTINS et al., 2007) (Fig. 2). Esse último procedimento, apesar de os espermatozóides entrarem em contato com sangue, é mais indicado, pois é rápido e de fácil execução.

Fotos: Carlos Frederico Martins

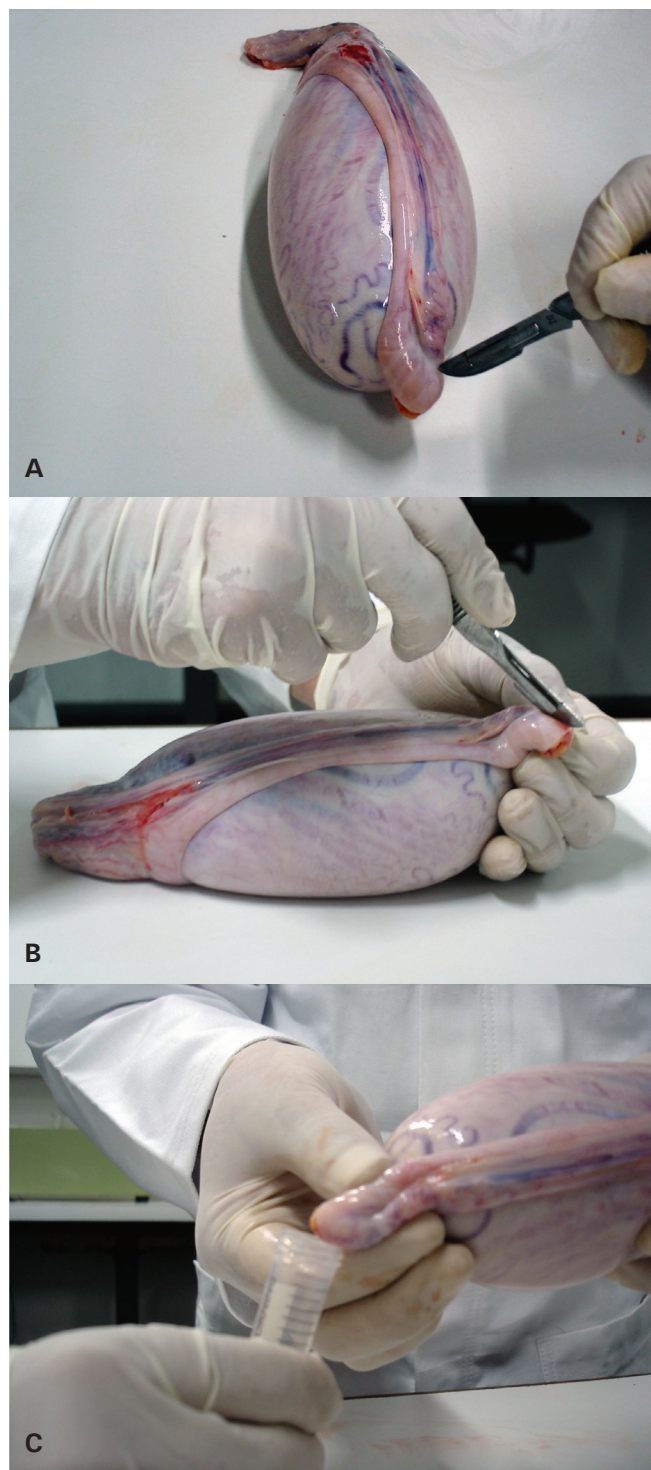


Fig. 2. Sequência de extração dos espermatozóides do epidídimo de bovinos mortos. Localização da cauda do epidídimo (A); incisão e pressão manual para extração dos espermatozóides (B); coleta dos espermatozóides em tubo graduado com meio de criopreservação (C).

Procedimento Prático de Criopreservação dos Espermatozóides do Epidídimo

Os espermatozóides viáveis recuperados do epidídimo devem ser diluídos com solução crioprotetora contendo açúcares (lactose e frutose), trizma base, ácido cítrico, 7 % de glicerol, gema de ovo e antibióticos (Tabela 1). Após a diluição, os espermatozóides devem ser armazenados em palhetas de 0,25 mL ou 0,50 mL na concentração de 15 a 20 $\times 10^6$ células. Em seguida, as palhetas devem ser equilibradas por um período de 4 horas em geladeira regulada a 5 °C, para que ocorra a troca da água intracelular pelo glicerol, o qual irá proteger internamente as células. Após esse equilíbrio, as palhetas devem ser resfriadas por 20 minutos em vapor de nitrogênio, a uma temperatura entre -80 °C e -120 °C. Finalmente, as palhetas deverão ser imersas em nitrogênio líquido e armazenadas até o momento da utilização.

Tabela 1. Componentes do meio de criopreservação.

Componentes	Quantidade
Trizma Base	12,11 g
Frutose	2,5 g
Lactose	2,5 g
Ácido Cítrico	6,8 g
Glicerol	Qsp para 100 mL
Água	68 mL
Penicilina	100 mg
Estreptomicina	100 mg

Inseminação Artificial

A inseminação artificial (IA) com espermatozóides criopreservados obtidos de epidídimos de bovinos mortos é semelhante ao procedimento de IA com sêmen do ejaculado. As fêmeas em cio devem ser inseminadas pela deposição da dose de espermatozóides no corpo do útero. A única diferença existente é que a dose inseminante com espermatozóides do epidídimo, em alguns casos, deve ser composta por mais palhetas, por causa da qualidade dos espermatozóides que diminui. A viabilidade dos espermatozóides recuperados do

epidídimo de bovinos pós-morte diminui por causa do resfriamento dos testículos durante o transporte, da forma de obtenção dos espermatozóides diretamente da cauda do epidídimo e do processo de criopreservação, uma vez que esses espermatozóides não entraram em contato com o líquido das glândulas anexas, sendo possivelmente mais sensíveis. Como já comprovado experimentalmente pela Embrapa Cerrados por meio do nascimento dos bezerros Hércules e Neo (Fig. 3), a inseminação artificial com espermatozóides do epidídimo de bovinos mortos com dose composta deve ter uma preparação adequada, como descrita a seguir.

Fotos: Fabiano Bastos

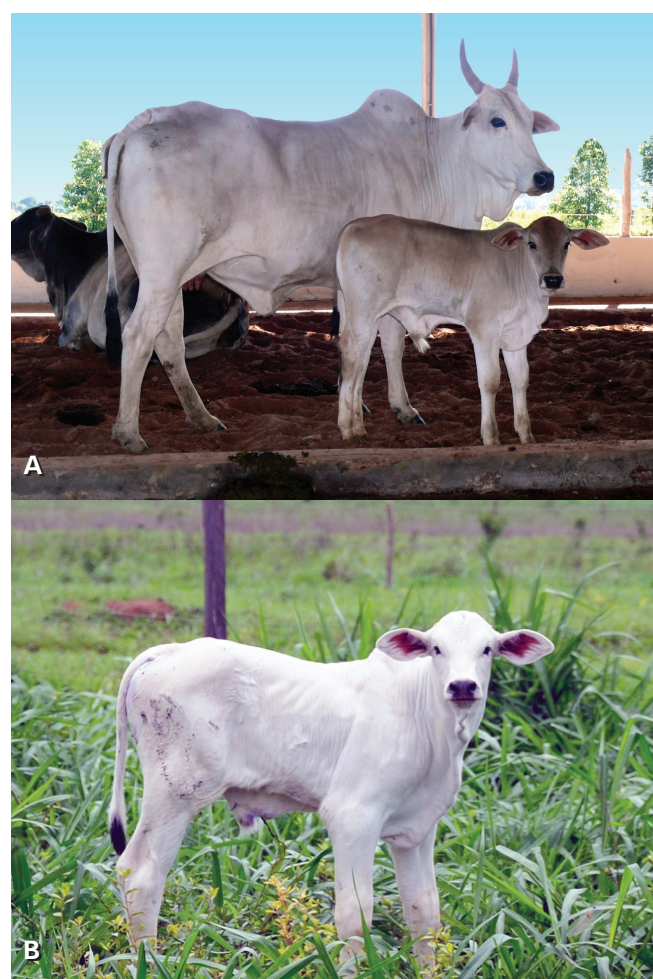


Fig. 3. Os bezerros Neo (A) e Hércules (B) nascidos após inseminação artificial com espermatozóides congelados recuperados do epidídimo refrigerado por três dias após a morte dos bovinos.

Antes da inseminação artificial, quatro palhetas contendo espermatozóides de diferentes animais devem ser descongeladas em água a 35 °C por 30 segundos. O conteúdo de uma das palhetas deverá permanecer reservado em um tubo de 1,5 mL para

posterior utilização. O conteúdo das outras três palhetas deve ser depositado em um tubo de 15 mL e centrifugado a 200 g por 5 minutos, para compor uma única dose inseminante. Após a centrifugação, o precipitado formado deverá ser diluído com o conteúdo da primeira palheta reservada, e a solução final com espermatozóides das quatro palhetas deverá ser acondicionada em uma única palheta de 0,5 mL para realização da inseminação artificial na fêmea em cio.

Fecundação in vitro

De acordo Martins et al. (2008), o procedimento de fecundação in vitro pode ser aplicado com os espermatozóides do epidídimo como descrito a seguir. Os complexos cumulus ovócitos, depois de aspirados dos folículos ovarianos, devem ser selecionados e transferidos para uma gota de 200 μ L de meio de maturação composto pelo TCM-199 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB, v:v), 24 IU/mL de LH, 10 μ g/mL de FSH e antibióticos (100 IU/mL de penicilina e 50 μ g/mL de estreptomicina). A gota de maturação deve ser coberta com óleo de silicone para evitar evaporação e em seguida incubada por 22 horas em estufa a 39 °C com 5 % de CO₂. Para a inseminação in vitro, a palheta com os espermatozóides do epidídimo deve ser descongelada em banho maria 35 °C. Espermatozóides móveis são obtidos pelo método de lavagem em meio TALP (centrifugação a 200 g por 10 minutos) e adicionados a gota de fecundação na concentração final de 1×10^6 espermatozóides/mL. Espermatozóides e ovócitos devem permanecer co-incubados por 18 a 20 horas a 39 °C com 5 % CO₂ no ar. Em seguida, os prováveis zigotos devem ser lavados em meio de cultivo e transferidos para as gotas de cultivo. O meio de cultivo sugerido é o SOFaaci, suplementado com 2.77 mM de myo-inositol e 5 % SFB em atmosfera umidificada com 5 % of CO₂ no ar a uma temperatura de 39 °C. Os embriões devem ser monitorados no segundo dia após a inseminação e no sétimo dia para avaliação do desenvolvimento dos embriões em blastocisto.

Considerações Finais

A recuperação e criopreservação de espermatozóides do epidídimo de bovinos

representam mais uma oportunidade para obtenção e utilização de material genético de interesse proveniente de animais que venham a morrer. A fecundação in vitro é a técnica mais adequada para utilização desse material, pois necessita de uma concentração menor de espermatozóides viáveis para a produção de embriões. Porém, o material também pode ser utilizado na inseminação artificial, desde que se avalie a necessidade de compor uma dose inseminante mais concentrada, utilizando-se mais palhetas a cada procedimento.

Referências

- FOOTE, R. H. Letter to the editor. **Journal of Andrology**, v. 21, p. 355, 2000.
- HEWITT, D. A.; LEAHY, R.; SHELDON, I. M.; ENGLAND, G. C. Cryopreservation of epididymal dog sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 67, p. 101-111, 2001.
- MARTINS, C. F.; RUMPF, R.; PEREIRA, D. C.; DODE, M. N. Cryopreservation of epididymal bovine spermatozoa from dead animals and its uses in vitro embryo production. **Animal Reproduction Science**, v. 101, p. 326-331, 2007.
- MARTINS, C. F.; DRIESSEN, K.; MELO COSTA, P.; CARVALHO-NETO, J. O.; DE SOUSA, R. V.; RUMPF, R.; DODE, M. N. Recovery, cryopreservation and fertilization potential of bovine spermatozoa obtained from epididymides stored at 5 °C by different periods of time. **Animal Reproduction Science**. In press doi:10.1016/j.anireprosci.2008.12.018.
- MARTINEZ-PASTOR, F.; GARCIA-MACIAS, V.; ALVAREZ, M.; CHAMORRO, C.; HERRAEZ, P.; DE PAZ, P.; ANEL, L. Comparison of two methods obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer. **Theriogenology**, v. 65, p. 471-485, 2005.
- TITTARELLI, C.; SAVIGNON, C. A.; ARNAUDI ´N, E.; STORNELLI, M. C.; STORNELLI, M. A.; DE LA SOTA, R. L. Effect of storage media and storage time on survival of spermatozoa recovered from canine and feline epididymides. **Theriogenology**, v. 66, p. 1637-1640, 2006.

Recovery and Cryopreservation of Spermatozoids from the Epididymides of Bovine Died for Use in the Artificial Insemination or in the Fecundation in vitro

Abstract – *The spermatozoa cryopreservation from the epididymides of dead animals is a possibility to avoid the loss of important genetic material. The spermatozoa recovered and cryopreserved can be used with success in different animal reproduction biotechnology, such as artificial insemination and in vitro fertilization. Thus, this technology can be considered a tool in the conservation of endangered animals or animals with considerable economic value.*

Index terms: *Endangered species, artificial insemination, in vitro fertilization, Livestock, sperm cryopreservation.*

**Comunicado
Técnico, 151**

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Cerrados

Endereço: BR 020 Km 18 Rod. Brasília/Fortaleza
Caixa postal: 08223 CEP 73310-970

Fone: (61) 3388-9898 **Fax:** (61) 3388-9879
sac@cpac.embrapa.br

Impresso no Serviço Gráfico da Embrapa Cerrados

1ª edição

1ª impressão (2008): 100 exemplares

**Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**



**Comitê de
publicações**

Presidente: *José de Ribamar N. dos Anjos*
Secretária Executiva: *Maria Edilva Nogueira*

Expediente

Supervisão editorial: *Fernanda Vidigal Cabral de Miranda*

Equipe de revisão: *Fernanda Vidigal Cabral de Miranda,
Francisca Elijani do Nascimento,
Jussara Flores de Oliveira Arbués*

Editoração eletrônica: *Wellington Cavalcanti*

Impressão e acabamento: *Divino Batista de Souza
Alexandre Moreira Veloso*