

RECUPERAÇÃO E AVALIAÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES OBTIDOS DE EPIDÍDIMOS BOVINOS RESFRIADOS POR DIFERENTES PERÍODOS

Fabiane Rodrigues Ferrao^{1*}, Francisco Bastos¹, David Germano Gonçalves Schwarz¹, Carlos Thiago S.A.M de Oliveira¹, Luiz Gustavo Bruno Siqueira¹, Guilherme Reis Blume¹, Priscila Melo Costa², Carlos Frederico Martins¹

¹ Embrapa Cerrados, CP 08223, 73310-970, Planaltina-DF, *fabyaneferrao@yahoo.com.br

² Universidade de Brasília – UnB, Brasília, DF

Introdução

Material genético tanto de animais de interesse econômico como de animais silvestres pode ser perdido a qualquer momento por morte animal não explicada. Neste caso, esforços podem ser realizados por meio da utilização das técnicas de reprodução assistida para evitar a perda total deste material genético de importância (Martins et al., 2007). A recuperação e a criopreservação de espermatozoides do epidídimo de animais mortos (recuperação pós-morte) é uma opção viável para preservar gametas masculinos e desta forma manter um banco de germoplasma (Tittarelli et al., 2006). Considerando a importância de se recuperar espermatozoides que seriam perdidos pela morte animal, este trabalho objetivou estudar as características morfológicas e funcionais dos espermatozoides bovinos recuperados de epidídimos resfriados por longos períodos e posteriormente criopreservados.

Material e Métodos

Testículos bovinos foram coletados em abatedouro, transportados ao laboratório à temperatura ambiente e divididos aleatoriamente em quatro grupos (n=5 testículos/grupo): G1 (0h), G2 (24h), G3 (48h) e G4 (72h) de acordo com o período após resfriamento a 5°C. Em cada período de armazenamento os espermatozoides foram recuperados da cauda dos epidídimos para avaliação da viabilidade. Várias incisões foram realizadas na cauda do epidídimo e então por pressão manual os espermatozoides foram liberados e coletados em tubos graduados de 15 ml (Figura 1). Os espermatozoides foram avaliados sob microscópio quanto a características físicas (motilidade, vigor e concentração) e morfológicas (patologias espermáticas). As amostras foram diluídas em meio Tris-gema com 7% glicerol, envasadas em palhetas de 0,25 mL (15x10⁶ espermatozoides/palheta), equilibradas por 4 horas a 5°C, mantidas em vapor de nitrogênio por 20 minutos e imersas em nitrogênio líquido a -196°C. Estas foram descongeladas a 35°C por 30 segundos, seguida de nova avaliação física e morfológica. Ainda, testes de funcionalidade (fecundação *in vivo*) foram realizados por meio de inseminação artificial de fêmeas bovinas com amostras G2 (24h) e G4 (72h).

Os dados foram submetidos à ANOVA e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste t a 5% de significância.



Figura 1. Sequência de extração dos espermatozoides do epidídimo de bovinos mortos. A - Localização da cauda do epidídimo; B - Incisão e pressão manual para extração dos espermatozoides; C - Colheita dos espermatozoides em tubo graduado com meio de criopreservação.

Conclusões

Foi possível constatar que os epidídimos de bovinos que morrem subitamente podem ser resfriados até 72 horas sem perdas funcionais relevantes, e assim, garantir a viabilidade dos espermatozoides para criopreservação e utilização em técnicas de reprodução animal.

Esta metodologia é uma importante ferramenta para auxiliar na conservação da biodiversidade de animais domésticos e silvestres, e ainda evitar a perda de material genético de animais com importância econômica.

Resultado e Discussões

Na Figura 2 estão demonstrados os resultados da avaliação morfológica dos espermatozoides recuperados do epidídimo. Em todas as amostras a patologia de cauda foi o principal defeito encontrado (26,7%), seguido por defeitos na peça intermediária (7,3%), sendo a gota protoplasmática proximal a principal anormalidade. Estas alterações são atribuídas a imaturidade do material recuperado diretamente do epidídimo. Os resultados demonstraram patologias características da imaturidade dos espermatozoides e redução da motilidade após o descongelamento (G0: 77,80±11,36 vs 52,00±13,03; G24: 65,0±9,74 vs 49,00±10,0; G48: 60,0±14,14 vs 34,00±15,16 e G72: 50,0±11,40 vs 20,0±14,83; pré e pós-criopreservação, respectivamente; P<0,05).

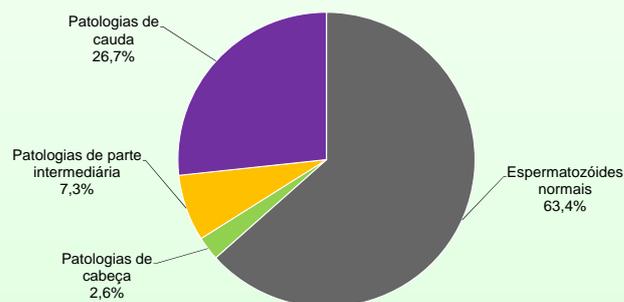


Figura 2. Percentual médio de espermatozoides normais e com patologias de cabeça, peça intermediária e cauda dos epidídimos antes do resfriamento.

Apesar dos defeitos espermáticos excessivos, da queda na motilidade e dos danos de membrana plasmática e acrossoma, o vigor espermático não foi afetado nem pelo resfriamento e nem após a criopreservação. A capacidade fecundante dos espermatozoides pós-criopreservação resultaram em duas gestações e dois nascimentos de bezerros saudáveis, um proveniente de espermatozoides do G2 (24h) e outro do G4 (72h) (Figura 3). Constatou-se que não houve perda da capacidade fecundante dos espermatozoides coletados de epidídimos resfriados a 5°C por até 72 horas, permitindo sua utilização em técnicas de reprodução animal.



Figura 3. Os bezerros Neo (A) e Hécules (B) nascidos após inseminação artificial com espermatozoides congelados recuperados do epidídimo refrigerados por 3 dias após a morte dos bovinos.

Literatura Citada

Martins, C.F. et al. Cryopreservation of epididymal bovine spermatozoa from dead animals and its uses in vitro embryo production. *Animal Reproduction Science*, 101: 326-331, 2007.
Tittarelli, C. et al. Effect of storage media and storage time on survival of spermatozoa recovered from canine and feline epididymides. *Theriogenology*, v.66, p.1637-40, 2006.