

Como colher e congelar sêmen de epidídimo de reprodutores terminais ou mortos

Cely Marini Melo, Frederico Ozanam Papa, Marco Antônio Alvarenga

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária,

FMVZ – UNESP, Botucatu – SP

celymarini@terra.com.br

Introdução

A utilização de biotecnologias modernas como a congelação de sêmen tem sido de grande importância na disseminação e preservação do potencial genético de diferentes espécies. Esta técnica possibilita uma distribuição cosmopolita do material genético dos reprodutores, além de viabilizar o armazenamento de sêmen de animais em extinção.

Deste modo, a congelação de amostras de epidídimo tem sido realizada em diferentes espécies: cães (Martins et. al., 2006; Hewitt et al., 2001), gatos (Tebet et. al., 2006; Axné et. al., 2004) com o objetivo de desenvolver técnicas adequadas ao armazenamento de germoplasma de animais silvestres.

Muitos proprietários de equinos solicitam a congelação das amostras de epidídimo como a última alternativa de preservar a genética valiosa de alguns garanhões. O sêmen obtido do epidídimo de garanhões encontra-se apto a realizar a fertilização (Barker and Gandier, 1957, Johnson et al. 1980), o que torna possível o seu armazenamento para uso futuro. Em algumas situações tanto o momento como o local da castração ou morte do animal não são adequados a manipulação e preservação adequadas das amostras do epidídimo, sendo necessária a sua refrigeração e transporte até centros especializados.

O objetivo do presente estudo é abordar os procedimentos de colheita e congelação de amostras oriundas do epidídimo de garanhões após a sua morte ou castração.

Transporte dos epidídimos

Para facilitar o procedimento de lavagem dos epidídimos, os mesmos deverão ser encaminhados juntamente com o cordão espermático, o qual deverá ser ligado para evitar o extravazamento de sangue e de sêmen do ducto deferente. Os conjuntos de testículos e epidídimos devem ser lavados externamente com solução de Ringer com Lactato e acondicionados em sacos plásticos ou até mesmo luvas de palpação. O procedimento de

castração, sempre que possível, deverá ser realizado antes ou imediatamente após a morte do animal.

Os epidídimos podem ser transportados em sistemas de refrigeração passiva para os centros especializados em recuperação e congelamento de amostras do epidídimo ou ainda processado no próprio haras por um técnico especializado (Bruemmer, 2006). Amostras oriundas de epidídimos refrigerados a 5°C durante 24 horas tem apresentado boa congelabilidade em diferentes espécies (Sharma et. al., 2007; Zomborsky et.al., 1999; Blash et.al., 2002; Marks et al., 1994).

Obtenção dos espermatozoides do epidídimo

Após a chegada no laboratório, os testículos são lavados com solução de Ringer com Lactato caso os mesmos encontrem-se com resíduos de sangue. Em seguida os epidídimos são separados dos testículos, sendo isolados a cauda do epidídimo e o ducto deferente. Os espermatozoides podem ser obtidos através de duas técnicas: flutuação e fluxo retrógrado.

A técnica de flutuação consiste no fatiamento da cauda do epidídimo em 12 a 15 segmentos e sua imersão em aproximadamente 5mL de diluente para sêmen (Cary et. al, 2004). Outra possibilidade seria o fluxo retrógrado, que consiste na obtenção dos espermatozoides através da lavagem do epidídimo, ducto deferente em direção a cauda, a qual é seccionada em diferentes segmentos da sua porção final. Conforme revisado por Bruemmer (2006), a utilização da técnica de fluxo retrógrado viabiliza a captação de um maior número de células espermáticas.

Para a lavagem são utilizados 40mL de Botu-Semen[®] (Biotech ME- Botucatu/SP) em cada epidídimo. Em seguida, as amostras são distribuídas em tubos de centrifuga de 50mL e centrifugadas a 600 x g, durante 10 minutos. O sobrenadante é dispensado e o *pellet* ressuspenso com o diluente de congelamento Botu-Crio[®] (Biotech ME- Botucatu/SP). As amostras são envasadas na concentração de 100×10^6 espermatozoides/ palheta de 0,5mL, mantidas a 5°C durante 20 minutos, submetidas ao vapor do nitrogênio do, ou seja 3 a 5 cm do nível líquido, durante 20 minutos e então imersas no nitrogênio. As amostras deverão ser descongeladas a 46°C por 20 sec (Dell'Aqua Jr et. al., 2001).

Fertilidade de sêmen do epidídimo

O primeiro relato de fertilidade com sêmen congelado na espécie equina refere-se a utilização de amostras congeladas do epidídimo (Barker & Gandier, 1957). Morris et. al. (2002) obteve 45% de fertilidade ao utilizar sêmen fresco do epidídimo fazendo uso da inseminação histeroscópica. Utilizando a mesma dose inseminante com sêmen congelado do epidídimo, obtiveram 18 e 8% de concepção quando as éguas foram inseminadas por histeroscopia e método convencional, respectivamente. Isso mostra que é possível a obtenção de produtos com sêmen de epidídimo mesmo com uma baixa dose inseminante (Morris et. al., 2002). Papa (dados não publicados), obtiveram 66,6% de fertilidade (12/18) com amostras de epidídimos transportados a 5°C por um período de 24 horas e então congeladas com o diluente Botu-Crio[®]. Estes resultados alcançados são extremamente importante e animadores, visto que até então os valores de fertilidade de sêmen congelado do epidídimo disponíveis na literatura apresentam-se muito baixos: 17% (Baker & Gandier, 1957); 18 e 8% (Morris et. al., 2002). O sucesso no incremento dos índices de fertilidade parece estar relacionado a composição do meio diluidor Botu-Crio[®], que tem a capacidade de promover a melhoria na congelabilidade e fertilidade se sêmen congelado de garanhões (Melo et. al., 2007).

Considerações finais

A congelação de sêmen do epidídimo pode ser a última oportunidade de se armazenar material de animais geneticamente superiores ou mesmo em extinção. Deste modo, a utilização de uma técnica adequada desde a colheita de epidídimos imediatamente após a morte ou castração, bem como o transporte dos epidídimos é de extrema importância para a qualidade das amostras a serem congeladas. A congelação de amostras do epidídimos em associação com outras biotécnicas é uma maneira de se obter mais produtos de um reprodutor após a sua morte. Deste modo, em situações onde o momento e o local da castração ou morte do animal não são adequados a manipulação e preservação adequadas das amostras do epidídimo, ou ainda o técnico não apresenta o domínio da técnica, os epidídimos deverão ser enviados a centros especializados para que o germoplasma não seja alterado e perdido.

Referências

- Axnér E, Hermansson U, Linde-Forsberg C. The effect of Equex STM paste and sperm morphology on post-thaw survival of cat epididymal spermatozoa. *Ani Reprod Sci*, v.84 (1-2), p.179 – 191, 2004.
- Barker CA, Gandier SCC. Pregnancy in a mare resulting from frozen epididymal spermatozoa. *Can J Comp Med*, v.21 (2), p.47-51, 1957.
- Blash S, Melican D, Gavin W. Cryopreservation of epididymal sperm obtained at necropsy from goats. *Theriogenology*, v.54, p. 899-905, 2002.
- Bruemmer JM. Collection and freezing od epididymal stallion sperm. *Ani Reprod Sci*, v.22, p.677-682, 2006.
- Cary JA, Madill S, Farnsworth K, Hayana JT, Duoos L, Fahning, A comparison of electroejaculation and epididymal sperm collection techniques in stallion. *Can Vet J*, v.45, p.35–41,2004.
- Dell'Aqua JA Jr, Papa FO, Zahn FS. Effects of warming rate on sperm parameters and of insemination site and dose on the fertility of equine frozen semen. *Anim Reprod Sci*, v.68, p.344–346, 2001.
- Hewitt DA, Leahy R, Sheldon IM, England GC. Cryopreservation of epididymal dog sperm. *Ani Reprod Sci*, v.67 (1-2), p.101 – 111, 2001.
- Johnson L, Amann RP, Pickett BW. Maturation of equine epididymal spermatozoa. *Am J Vet Res*, v.41, p.1190-1196, 1980.
- Marks SL, Dupus J, Mickelsen WD, Memon MA, Platz CC Jr. Conception by use of postmortem epididymal semen extraction in a dog. *J Am Vet Med Assoc*, v.204, p.1639–1640,1994.
- Martins MIM, Justino RC, Pereira FD, Perches CS, Chirinéa VH, Lopes MD. The effect of two solutions in the morphological characteristics and in the freezing of spermatozoa obtained from epidymis of dogs and cats: preliminary results. *Anim Reprod*, v.3, p.265, 2006. (Resumo)
- Melo C, Zahn F, Martin I, Orlandi C, Dell'aqua Jr JA, Alvarenga MA, Papa FO. Influence of Semen Storage and Cryoprotectant on Post-thaw Viability and Fertility of Stallion Spermatozoa. *J Equine Vet. Sci.*, v.27 (4), p.171-175, 2007.

Morris L, Tiplady C, Allen WR. The in vivo fertility of cauda epididymal spermatozoa in the horse. **Theriogenology**, v.58, p.643-646. 2002.

Sharma RK, Padron OF, Thomas AJ, Agarwal A. Factors associated with the quality before and after thawing of sperm obtained by microsurgical epididymal aspiration. *Fertil Steril*, v.68, p.626–631, 1997.

Tebet J, Martins MI, Chirinea V, Souza F, Campagnol D, Lopes M. Cryopreservation effects on domestic cat epididymal versus electroejaculated spermatozoa. *Theriogenology*, v.66 (6-7) , p.1629 – 1632, 2006.

Zomborsky Z, Zubor T, Toth J, Horn P. Sperm collection from shot red deer stags (*Cervus elaphus*) and the utilization of sperm frozen and subsequently thawed. *Acta Vet Hung*, v.47, p.263–270, 1999.