

AVALIAÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL DE ESPERMATOZÓIDES BOVINOS COLETADOS A PARTIR DE EPIDIDÍMOS RESFRIADOS POR 24, 48 E 72 HORAS PÓS-MORTE ANIMAL.

Driessen, K.^{1,2}; Carvalho, J.O.^{1,2}; Costa, M. P.¹; Dode, M.A.N.¹; Martins, C.F.^{1,3}; Rumpf, R.¹

¹Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 70770 - 900, Brasília - DF, Brasil; ²FAV - UnB, 70910 - 970, Brasília - DF, Brasil; ³Geneal, 38001 - 970, Uberaba - MG, Brasil. rodolfo@cenargen.embrapa.br

Espermatozoides coletados do epidídimo, associados com biotécnicas da reprodução, podem ser usados como um importante método na produção da descendência de animais de alto valor genético e na conservação após a morte. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência do tempo de resfriamento de testículos bovino sobre a qualidade e viabilidade dos espermatozoides após criopreservação. Foram coletados testículos de 12 touros abatidos em frigoríficos da região de Brasília-DF. O material coletado foi resfriado à 4°C por 24 (G24), 48 (G48) e 72 (G72) horas pós-morte, com cada grupo constituído por 4 testículos de diferentes animais. Após cada período de armazenamento, os espermatozoides foram obtidos da cauda dos epidídimos por incisões e pressão manual, criopreservados com Tris-gema-glicerol e armazenados em nitrogênio líquido. As amostras de cada grupo e sêmen do ejaculado já testado para produção *in vitro* de embriões (grupo controle, GC) foram descongeladas à 36°C. Um pool de espermatozoides de cada grupo foi utilizado na produção *in vitro* de embriões (PIVE), sendo que antes e após a preparação espermática foram retidas amostras para avaliação da qualidade espermática. Foram realizadas avaliações de motilidade progressiva, morfologia espermática (contraste de fase), integridade de membrana plasmática (iodeto de propídeo e diacetato de carboxifluoresceína), integridade acrossomal (Peanut agglutinin [PNA] – fluorescein isothiocyanate [FICT]) e integridade de DNA (orange acridine). Na FIV, os espermatozoides foram lavados em meio de capacitação (Nutricell®) e centrifugados por 5 minutos à 700G. Os ovócitos fecundados foram avaliados quanto à taxa de clivagem em D2 (48h) e a taxa de blastocisto entre D6 e D8. Os resultados da qualidade espermática foram analisados utilizando-se ANOVA, Teste de Duncan e os da PIVE utilizando teste de qui-quadrado. A proporção de espermatozoides morfolologicamente normais, tanto na pré, quanto na pós lavagem, foi maior (P<0,05) no GC (93,7± 0,7 e 93,4±0,6) que nos grupos G24 (81,8± 2,2 e 84,0±4,0), G48 (82,9±2,6 e 83,5±3,3) e G72 (83,4± 4,7 e 83,2±5,1), respectivamente. A motilidade progressiva, integridade de membrana plasmática, acrossoma e DNA, pré e pós-lavagem, foi semelhante (P>0,05) entre os grupos. Na PIVE, a taxa de clivagem foi maior (P<0,05) no GC (74,1%) que no G24 (48,5%), G48 (42,8%) e G72 (38,9%), que foram semelhantes entre si. A taxa de blastocisto em D7 foi maior (P<0,05) no GC (17,24%) que no G24 (4,6%), G48 (1,1%) e G72 (4,1%), que foram semelhantes entre si. A taxa de blastocisto em D8 foi maior (P<0,05) no GC (29,2%) que no G24 (11,2%), G48 (3,4%) e G72 (5,7%) sendo que no G24 foi maior que G48 e esse semelhante ao G72. Desta forma podemos concluir que espermatozoides bovinos, oriundos de testículos resfriados por até 72 horas, mantêm a integridade estrutural da célula espermática, havendo uma perda da integridade funcional espermatozoides, no entanto, em todos os grupos houve produção de embriões. Assim, o resfriamento dos epidídimos seguido da criopreservação dos espermatozoides se configura em uma excelente estratégia na produção de embriões para conservação animal, especialmente em regiões distantes de um laboratório. Apoio financeiro: apoio da Embrapa – Macroprograma II.

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL EVALUATION OF BOVINE SPERM CELL COLLECTED FROM EPIDIDYMIDES, COOLED FOR 24, 48 AND 72 HOURS AFTER DEATH

Spermatozoa collected from epididymides, associated with assisted reproduction biotechnologies, can be used as an interesting system in offspring production and conservation of high genetic merit animals after their death. The purpose of this study was to evaluate the influence of cooling time of bovine testicles on spermatozoa quality and viability after cryopreservation. Testicles were collected from 12 bulls slaughtered in abattoir in Brasília - DF. The collected testis were cooled about 4°C and stored for 24 (24G), 48 (48G) and 72 (72G) hours after animal death. Each time cooling group was composed by four testicles from distinct animals. After each storage period, the spermatozoa were recovered from epididymides by performing small cuts in the tail and pressuring manually. The spermatozoa recovered were cryopreserved with Tris-yolk-glycerin and stored in liquid nitrogen. For the control group (CG) ejaculated frozen semen from a bull with known *in vitro* fertility was used. Semen samples from all groups were thawed a 36°C. A pool of spermatozoa from each group was used for *in vitro* embryo production, from that pool samples were removed for sperm cell evaluation before and after sperm preparation. Progressive motility, sperm morphology (phase contrast), plasma membrane integrity (propidium iodide, carboxyfluorescein diacetate), acrosome integrity (Peanut agglutinin [PNA] – fluorescein isothiocyanate [FICT]) and DNA integrity (orange acridine) were evaluated. For *in vitro* fertilization (IVF), spermatozoa were washed in capacitation medium (Nutricell®) and centrifuged for 5 minutes at 700G. The fertilized oocytes were evaluated for cleavage rate in D2 (48h *pi*) and blastocysts rate on D8. The sperm quality results were analyzed by ANOVA, Duncan test, and IVP results by qui-square test. The percentage of spermatozoa morphologically normal, before and after washing, was higher (P<0.05) in CG (93.7± 0.7 and 93.4±0.6) than in the groups 24G (81.8± 2.2 and 84.0±4.0), 48G (82.9±2.6 and 83.5±3.3) and 72G (83.4± 4.7 and 83.2±5.1). The progressive motility, plasma membrane, acrosome and DNA integrity, before and after washing, were similar among groups. The cleavage rate was higher (P<0.05) in CG (74.1%) than in the 24G (48.5%), 48G (42.8%) and 72G (38.9%) groups, that were similar among themselves. The blastocyst rate was higher (P<0.05) in GC (29.2%) than in G24 (11.2%), G48 (3.4%) and G72 (5.7%), being the rate in G24 higher than in G48, which was similar to G72. This way, it follows that bovine spermatozoa, originated from cooled testicles conserved the structural integrity but lost functional integrity, however, there were embryo production. Thus, the epididymus cooled followed spermatozoa cryopreservation to be formed an excellent strategic to use in embryo production to animal conservation, specially in distances regions of laboratory.