



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

ANDRÉIA MARIA DA SILVA

**CONSERVAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMÁRIOS DE PREÁS
(*Galea spixii* WAGLER, 1831) EM DIFERENTES MEIOS.**

MOSSORÓ

2016

ANDRÉIA MARIA DA SILVA

**CONSERVAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMÁRIOS DE PREÁS
(*Galea spixii* WAGLER, 1831) EM DIFERENTES MEIOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, como exigência final para obtenção do título de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: Morfofisiologia e Biotecnologia da Reprodução Animal.

Orientador: Dr. Alexandre Rodrigues Silva - UFERSA

MOSSORÓ - RN

2016

©Todos os direitos estão reservados à Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do autora Andréia Maria da Silva, sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996, e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tornar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata, exceto as pesquisas que estejam vinculadas ao processo de patenteamento. Esta investigação será base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) seja devidamente citado e mencionado os seus créditos bibliográficos.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
BIBLIOTECA CENTRAL ORLANDO TEIXEIRA - CAMPUS MOSSORÓ
Setor de Informação e Referência

S586c Silva, Andréia Maria da.

Conservação de espermatozoides epididimários de preás (*Galea spixii* Wagler, 1831) em diferentes meios / Andréia Maria da Silva. - Mossoró, 2016.

101f. il.

Orientador: Alexandre Rodrigues Silva

Dissertação (MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

1. Preá. 2. Criopreservação. 3. Roedor. 4. Animal silvestre. 5. TRIS - diluente. I. Título

RN/UFERSA/BOT/006

CDD 599.3592

ANDRÉIA MARIA DA SILVA

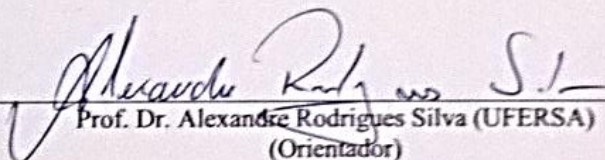
**CONSERVAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMÁRIOS DE PREÁS
(*Galea spixii* WAGLER, 1831) EM DIFERENTES MEIOS.**

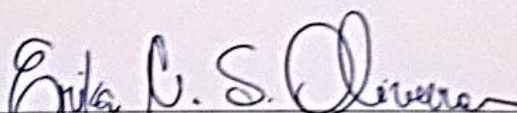
Dissertação apresentada à Universidade
Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA,
como parte das exigências para obtenção do
título de Mestre em Ciência Animal.

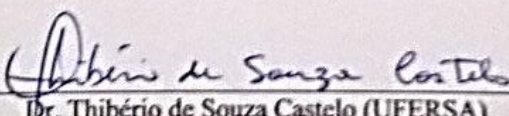
Linha de Pesquisa: Morfofisiologia e
Biotecnologia da Reprodução Animal.

APROVADA EM: 16/02/2016

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Alexandre Rodrigues Silva (UFERSA)
(Orientador)


Prof (a) Dra. Erika Christina dos Santos Oliveira (UFRPE)


Dr. Thibério de Souza Castelo (UFERSA)

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

ANDRÉIA MARIA DA SILVA – Nascida no Município de Parelhas-RN no dia 02.09.1989, filha de Afonso Getúlio da Siva e Terezinha Eulália Franco da Silva, concluiu o Ensino Médio no Colégio Agrícola de Jundiá - RN. Graduiu-se em Zootecnia pela Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) em 2013.1, onde foi bolsista de PIBIC pelo período de três anos. Durante a graduação desenvolveu trabalhos com tecnologia de sêmen em catetos (*Pecari tajacu*) e espermatozoide epididimário de preá (*Galea spixii*), além de colaborar com pesquisas de fêmeas silvestre junto ao Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal. Em Dezembro de 2013 foi selecionado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal pela UFERSA.

A minha mãe, Terezinha Eulália
Franco da Silva pelo amor
incondicional

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar a oportunidade e as condições necessárias durante toda a minha vida, sempre me guiando e colocando pessoas maravilhosas no meu caminho, e principalmente por me dar o dom da vida. Assim como aos meus guias espirituais pelos auxílios e conselhos necessários para minha evolução espiritual nessa caminhada terrena.

À meus pais Terezinha Eulália Franco da Silva e Afonso Getúlio da Silva, por terem me criado com dignidade, e por todos os anos que me deram amor e incentivo aos estudos. Amo muito vocês.

Aos meus irmãos (Antônio e Alexandre), a minha cunhada (Inária), e ao meu sobrinho Emanuel Hugo e Italo Antônio que veio ao mundo para alegrar a família.

À equipe do Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal da UFRSA, pela ajuda, sugestões e críticas feitas em toda a jornada científica, e por tornarem essa jornada mais alegre.

Ao Profº Dr. Alexandre Rodrigues Silva, pela paciência e ensinamento dados a mim durante essa caminhada.

Ao Profº Moacir Franco de Oliveira, pela ajuda e paciência na execução deste trabalho.

Aos funcionários do CEMAS - UFRSA, em especial a Almeida, todos foram essenciais para a execução desse trabalho.

“Não te canses de amar.
É possível que a resposta do amor
não te chegues imediatamente.
Talvez te causem surpresa as
reações que propicia. É possível que
as haja desencorajadas. Sucedem que,
desacostumadas aos sentimentos
puros, as pessoas reagem por
mecanismos de auto-defesa.
Insistindo, porém, conseguirás
demonstrar a excelência desse
sentimento sem limite e mimetizarás
aqueles a quem amas, recebendo
de volta a benção de que se reveste.
Ama, portanto, sempre.”

Joanna de Ângelis

CONSERVAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMÁRIOS DE PREÁS (*Galea spixii* WAGLER, 1831) EM DIFERENTES MEIOS. SILVA, Andréia Maria. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal: Morfofisiologia e Biotecnologia da Reprodução Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2016.

RESUMO:

O preá é um roedor silvestre que ocorre em todo o bioma caatinga, ainda pouco estudado quanto ao desenvolvimento de biotécnicas reprodutivas para sua conservação ou multiplicação. A presente dissertação configurou-se em dois experimentos, sendo que o primeiro objetivou definir o meio ideal para a conservação da longevidade dos espermatozoides de preás. Espermatozoides epididimários de 09 indivíduos foram obtidos por flutuação, testando-se os diluentes TES e TRIS, e permanecendo incubados por 180 minutos a 37 °C, em um teste de termorresistência (TTR). Como resultados, verificou-se que imediatamente após a recuperação, as amostras diluídas em TRIS apresentaram resultados superiores de motilidade, vigor, integridade da membrana e atividade mitocondrial do que as recuperadas com TES, mantendo se dessa forma até os 180 minutos ($P < 0,05$). Assim, conclui-se que o diluente TRIS é o mais indicado para a colheita e conservação dos espermatozoides epididimários de preás. No segundo experimento, avaliou-se o efeito de diferentes crioprotetores sobre parâmetros morfofuncionais de espermatozoides de preás. Espermatozoides oriundos dos epidídimos de 12 machos foram coletados por lavagem retrógrada em TRIS e criopreservados neste diluente acrescido de 20% de gema de ovo, e dos crioprotetores glicerol ou dimetilsulfóxido (DMSO) em concentrações de 3%, 6% e 9%. Após descongelação, verificou-se que o glicerol, em qualquer concentração fornecida, apresentou resultados mais eficiente que o DMSO na conservação dos parâmetros cinéticos da motilidade avaliados pela análise computadorizada, bem como da integridade funcional e estrutural da membrana plasmática ($P < 0,05$). Além disso, o glicerol a 6% e 9% mostrou-se mais eficiente em preservar a capacidade dos espermatozoides de preás em se ligarem à membrana perivitelina da gema do ovo de galinhas ($P < 0,05$). Diante disso, sugere-se o uso de glicerol (6 ou 9%) para a criopreservação de espermatozoides epididimários de preás.

Palavras-chave: Roedor, TES, TRIS, animal silvestre, criopreservação.

CONSERVATION OF EPIDIDYMAL SPERMATOZOA OF SPIX'S YELLOW-TOOTHED CAVIES (*Galea spixii* Wagler, 1831) IN DIFFERENT EXTENDERS. (*Galea spixii*). SILVA, Andréia Maria. 2016. Dissertation (Masters in Ciência Animal: Morfofisiologia e Biotecnologia da Reprodução Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2016.

ABSTRACT:

The spix's yellow-toothed cavies is a rodent present in the Brazilian Caatinga, and the development of reproductive biotechniques for its conservation or multiplication is still understudied. This present dissertation was established in two experiments. The first one had the objective to define the ideal media solution to conserve spix's yellow-toothed cavies sperm longevity. Epididymides sperm of 09 spix's yellow-toothed cavies was obtained by flotation, testing TES and TRIS diluents, which samples were incubated for 180 minutes at 37 °C for a thermal resistance test (TTR). Samples recovered in TRIS showed better sperm motility, vigor, membrane integrity and mitochondrial activity than those recovered with TES, maintaining better results until 180 minutes ($P < 0.05$), therefore, the use of TRIS is more indicated for spix's yellow-toothed cavies sperm retrieval and conservation. In the second experiment, we evaluated the effect of different cryoprotectants on morphological and functional parameters of cavy sperm after cryopreservation. Epididymides sperm from 12 male spix's yellow-toothed cavies was obtained by retrograde flushing using TRIS, and cryopreserved in this diluent with the addition of 20% of egg yolk and the cryoprotectants glycerol or dimethyl sulfoxide (DMSO) in concentrations of 3%, 6% and 9%. After thawing, we observed that glycerol was more efficient than DMSO in all concentrations used, better conserving the kinetic parameters of sperm cells evaluated by computer analysis, as well as the functional and structural plasma membrane integrity ($P < 0.05$). Glycerol at 6% and 9% was more efficient on preserving the binding capacity to egg-yolk perivitelline membrane ($P < 0.05$). In light of this, we suggest the use of glycerol (6% or 9%) for the conservation of spix's yellow-toothed cavies epididymis sperm.

Keywords: Rodent, TES, TRIS, wild animal, cryopreservation.

LISTAS DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
~	Semelhante
<	Menor
=	Igual
>	Maior
±	Mais ou menos
×	Vezes
®	Marca registrada
°C	Grau Celsius
μL	Microlitro
μm	Micrômetros
μm/s	Micrômetro por segundos
μg/mL	Micrôgrama por mililitro
10 ⁶	Milhões
ACP	Agente crioprotetor
ALH	Deslocamento lateral da cabeça
ANOVA	Análise de variância
BCF	Frequência de batimento cruzado
BOD	Incubadora biológica com demanda de oxigênio (biological oxygen demand incubator)
BTS	Beltsville Thawing Solution
BSA	Albumina sérica bovina
CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloreto de cálcio diidratado

CASA	Análise Computadorizada do Sêmen
CEUA	Comitê de Ética Animal
CEMAS	Centro de Multiplicação de Animais Silvestres
C-FDA	6-carboxifluoresceína diacetato
cm	Centímetro
CMXRos	Cloreto de 8-(4-clorometil) fenil 2,3,5,6,11,12,14,15 octahidro-1 H, 4H, 10H, 13H-diquinolisino-8H-xantílio (MitoTracker red®)
CO ₂	Dióxido de carbono
COCs	<i>Complexos cumulus</i> -oócito
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic Acid)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPBS	Solução Fosfatada Tamponada Dulbecco
CFDA	Diacetato de carboxifluoresceína
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
h	Hora
H-342	Hoechst 3342
HOST	Teste hiposmótico (Hypoosmotic Swelling Test)
Hz	<i>Hertz</i>
ICMBIO	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
IP	Iodeto de Propídio
IV	Intra venosa
IUCN	União Internacional de Conservação da Natureza
LIN	Índice de linearidade
KCl	Cloreto de potássio
M	Molar

m	Metro
mM	Milimolar
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
mg/mL	Miligrama por mililitro
mg.kg ⁻¹	Miligrama por Kilograma
mEq.kg ⁻¹	Miliequivalente por Kilograma
Min	Minuto
mL	Mililitro
mL/kg	Mililitro por Kilograma
mM	Milimolar
mOsm/L	Miliosmol por litro
n	Número
NaCl	Cloreto de Sódio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NaH ₂ PO ₄	Dihidrogeno fosfato de sódio
pH	Potencial hidrogeniônico
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio (Reactive Oxygen Species)
SEM	Erro padrão
STR	Índice de progressão
TES	(N-[Tris(hidroximetil)-metil]-2-aminoetanosulfônico)
TRIS	Tris - trihidroximetil amino metano
TTR	Teste de termorresistência
UFERSA	Universidade Federal Rural do Semi-Árido
V	Volt

VAP	Velocidade do percurso médio
VCL	Velocidade do percurso curvilíneo
VSL	Velocidade em linha reta

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características de espermatozoides epididimários oriundos de preás (<i>Galea spixii</i>) (n=9) criados em cativeiro, obtidos por diferentes métodos de coleta (Silva, 2013).	23
Tabela 2. Total de espermatozoides (Média $\pm$ EP) ligados à membrana perivitelina do ovo de galinha, em amostras frescas e descongeladas, de diferentes espécies mamíferas.	33
Capítulo 1 -	
Table 1. Morphological characteristics (Mean $\pm$ SEM) of Spix's yellow-toothed cavy epididymal sperm (n = 9), recovered with TES or TRIS, and submitted to a thermal resistance test (TRT) for 180 minutes.	58
Capítulo 2 -	
Table 1. Mean values ($\pm$ S.D.) for fresh and frozen/thawed epididymal sperm characteristics collected from Spix's yellow-toothed cavies (<i>Galea spixii</i>) (n = 12).	78
Table 2. Kinetic motility patterns (mean $\pm$ S.D.) observed in Spix's yellow-toothed cavies (<i>Galea spixii</i>) fresh and frozen/thawed epididymal sperm (n = 11) by computerized assisted semen analysis – CASA.	79
Table 3. Mean ($\pm$ S.D.) and range values for Spix's yellow-toothed cavies (<i>Galea spixii</i>) fresh and frozen-thawed sperm bound to the hen's yolk perivitelline membrane (n = 11).	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Galea spixii</i> (Arquivo LCGA)	20
Figura 2. Espermatozoide epididmário <i>Galea spixii</i> (Arquivo LCGA)	22
Capítulo 1 -	
Figure 1. Values (Mean $\pm$ SEM) of motility (A), vigor (B), structural membrane integrity (C), membrane functionality (D), damaged plasmatic membrane and inactive mitochondria (E) from Spix's yellow-toothed cavy epididymal sperm (n =9) during the thermal resistance test (TRT) using TES-based and TRIS-based extenders	57

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1. BIOLOGIA DO PREÁ (<i>Galea spixii</i>)	20
2.1.1. Coleta de espermatozoides epididimários.....	22
2.2. CRIOPRESERVAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMÁRIOS	23
2.2.1. Diluente	25
2.2.2. Agentes crioprotetores (ACPs)	25
2.2.2.1 Glicerol.....	26
2.2.2.2 Dimetilsulfóxido (DMSO).....	26
2.3. AVALIAÇÃO DOS ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMÁRIOS	27
2.3.1. Avaliação inicial	27
2.3.1. Teste de Termorresistência (TTR)	29
2.3.3. Análise Computadorizada de Sêmen (CASA)	30
2.3.4 Avaliação da cromatina espermática	31
2.3.5. Avaliação da capacidade ligante do espermatozoide.....	32
3. JUSTIFICATIVA	34
4. HIPÓTESES CIENTÍFICAS.....	35
5. OBJETIVOS.....	36
5.1. Geral	36
5.2. Específicos.....	36
6. REFERÊNCIAS	37
CAPÍTULO 1 - EFEITO DE DIFERENTES DILUENTES NA QUALIDADE DE ESPERMATOZOIDES RECUPERADOS DOS EPIDÍDIMOS DE PREÁS (<i>Galea Spixii</i>).....	50
CAPÍTULO 2 - CRYOPRESERVATION OF SPIX'S YELLOW-TOOTHED CAVIES EPIDIDYMAL SPERM (<i>Galea spixii</i> WAGLER. 1831).....	66
CONCLUSÃO GERAL	92
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTVAS	924

1. INTRODUÇÃO

O preá (*Galea spixii*) é uma espécie endêmica da região nordestina, culturalmente utilizado como fonte de proteína animal por comunidades locais. Contudo, a cultura da caça predatória aliada à destruição de seus habitats naturais vem causando redução na população dessa espécie (SANTOS et al., 2009). Tal fato implica no desequilíbrio da cadeia alimentar, uma vez que pequenos roedores servem de alimento para diversas espécies, como aves de rapina, cobras, canídeos e felinos selvagens (OLIVEIRA, et. al, 2008). Assim, a criação em cativeiro surge como uma alternativa para a sua conservação e melhoria da renda da população local, em algumas regiões do Brasil (SANTOS et, al., 2009). Em adição, por ser de pequeno porte, fácil adaptação em cativeiro, baixo custo de manutenção e ter um curto período de gestação (OLIVEIRA et al 2008; BJÖRKMAN et al., 1989), os preás apresentam grande potencial para serem empregados como modelo experimental para duas espécies de rato-do-mato (*Kunsia fronto*; *Wilfredomys oenax*) considerados criticamente ameaçados e o ouriço-preto (*Chaetomys subspinosus*) considerável vulnerável a extinção pelo ICMbio (ICMBIO, 2014).

Dada à importância dessa espécie, ressalta-se a necessidade do desenvolvimento de técnicas para a conservação de seu material genético, em especial aos gametas masculinos. Desse modo, é necessário a adequação de diluentes que preservem a qualidade espermática durante a colheita dos espermatozoides epididimários, assim como o estabelecimento de um protocolo de criopreservação eficiente, no qual a escolha do agente crioprotetor é fundamental para minimizar os danos causados por essa biotécnica.

No tocante ao diluente, esse tem a finalidade básica de interagir com o gameta, preservando a integridade e habilidade fecundante através do equilíbrio eletrolítico e osmótico, atuando também no fornecimento de energia (JOHNSON et al., 2000; CHACUR et al., 2012). Nesse contexto, o uso de diferentes diluentes tem sido empregado com sucesso na recuperação de espermatozoides epididimários em roedores, sendo o TES reportado com sucesso em chinchilas (PONCE et al., 1998), ratos (VARISLI et al., 2013) e preás (SILVA, 2013), bem como o TRIS, em cutias (SILVA et al., 2011) e ratos (VARISLI et al., 2015). Entretanto, é essencial que o diluente seja compatível com as particularidades espermáticas, como as diferenças na composição da membrana plasmática de cada espécie e assim diminuir a ocorrência de danos aos espermatozoides (ARAUJO et al., 2013). Assim, MAMPOUYA, (1973) descreveu o uso do teste de

termorresistência (TTR) para discriminar diluidores eficientes na conservação da longevidade espermática em ovinos. Tal teste consiste na avaliação da sobrevivência dos espermatozoides ao longo do tempo.

Em relação à criopreservação de espermatozoides, a adequação dos agentes crioprotetores é primordial, tendo em vista a manutenção da qualidade espermática. Essas substâncias proporcionam proteção à célula durante a redução da temperatura, auxiliando na estabilização da membrana plasmática e evitando a formação de cristais de gelo (HU et al., 2009; CASTRO et al., 2011). Nesse contexto, dentre os crioprotetores utilizados na conservação de espermatozoides epididimários, o glicerol tem sido reportado para cutias (SILVA et al., 2011) e ratos (VARSILI et al., 2013). Por outro lado, o uso do dimetilsulfóxido (DMSO) tem sido citado para as cutias (CASTELO et al., 2015) e camundongos (COOPER et al., 2008). Sabe-se, no entanto, que o uso de tais substâncias em concentrações inadequadas pode apresentar efeitos tóxicos sobre as células espermáticas (ALVARENGA et al., 2000). Logo, a escolha do diluente adequado para a colheita de espermatozoides diretamente do epidídimo, bem como o estabelecimento de um crioprotetor que possibilite a conservação do material genético através da criopreservação são necessários, visto que não há descrição na literatura de conservação espermática nesta espécie.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. BIOLOGIA DO PREÁ (*Galea spixii*)

O preá (*Galea spixii*) é uma espécie endêmica da região nordestina que apesar de ser culturalmente caçado para uso como fonte de proteína animal (SANTOS et al., 2009), tem sua população considerada como estável (IUCN, 2015). Essa espécie é bem adaptada ao cativeiro e apresenta potencial para ser utilizada como modelo experimental (OLIVEIRA et al 2008; BJÖRKMAN et al., 1989).

No tocante a sua taxonomia, a espécie *Galea spixii* pertence à família *Caviidae*, subfamília *Caviinae* e gênero *Galea* (REIS et al., 2006), sendo caracterizada como um animal de pequeno porte, com variação do tamanho e peso corporal entre machos e fêmeas (OLIVEIRA et al., 2008). A coloração de sua pelagem varia de cinza a amarela na região dorsal, sendo que suas patas são semelhantes ou mais claras que o dorso, enquanto que na superfície ventral podem ter pelos brancos ou branco-amarelados. Em adição, observa-se um anel de pelos brancos circundando os olhos, cauda atrofiada, apresentando quatro dígitos nos membros anteriores e apenas três nos posteriores (REIS et al., 2006). Na natureza, tem atividade diurna, alimentando-se de folhas, caules, frutos, trepadeiras, raízes, tubérculos e casca de árvores jovens, vivendo em bandos (REIS et al., 2006; MENDES, 1987).



Figura 1: *Galea spixii* (Arquivo Pessoal)

Com relação aos seus aspectos reprodutivos, seu sistema de acasalamento é classificado como poligâmico (TARABORELLI e MORENO, 2009), reproduzindo-se durante todo o ano na natureza e em cativeiro, gerando de seis a sete ninhadas anuais,

com duração do período gestacional de 48 dias, podendo gerar de 2 a 4 crias por cada gestação (OLIVEIRA et al., 2008).

No tocante ao aparelho reprodutor dos preás, os testículos são ovóides, podendo ser localizados no canal inguinal, cavidade abdominal, ou em posição inguinal, com escroto bem delimitado. O epidídimo é composto de três regiões bem distintas: cabeça, corpo e cauda; sendo formado pelo ducto epididimário, o qual consiste da união dos túbulos eferentes, que se enovelam, enclausurados em uma cápsula para formar o epidídimo. Emergindo da margem medial da cauda do epidídimo, observam-se os ductos deferentes. Estes ductos seguem medialmente em direção à bexiga urinária, cruzando ventralmente o ureter, e seguindo em paralelo aos ductos das glândulas vesiculares, penetrando na uretra, no colículo seminal, junto com o ducto da glândula vesicular, formando o ducto ejaculatório. Esse órgão tubular que apresenta seu diâmetro aumenta à medida que se aproxima da uretra, onde forma a ampola do ducto deferente, ainda há presença das três glândulas acessórias (próstata, vesículas seminais e bulbouretrais). O pênis é cilíndrico com uma flexura cranial curvando-se caudalmente, sendo composto por raiz, corpo e glândula e, nessa última estrutura, são encontrados os espículos (RODRIGUES et al., 2013).

O desenvolvimento sexual dessa espécie é classificado nos seguintes estágios: imaturo, que abrange do nascimento aos 15 dias de vida; pré-púbere, que corresponde até os 30 dias; púbere, de 45 a 105 dias; e pós-púbere, de 120 a 150 dias. A espermatogênese inicia-se aos 30 dias de vida, porém somente aos 45 dias há presença de espermatozoides no lúmen dos túbulos seminíferos. Ao atingirem a idade de 120 a 150 dias, todos os túbulos seminíferos apresentam áreas luminais com células em diferentes fases de divisão (SANTOS et al., 2012).

O espermatozoide de *G. spixii* foi descrito pela primeira vez por Silva (2013), apresenta as seguintes mensurações: largura de cabeça $3,04 \pm 0,0 \mu\text{m}$, comprimentos da cabeça, da peça intermediária e da cauda $4,61 \pm 0,1 \mu\text{m}$, $5,13 \pm 0,0 \mu\text{m}$, $44,26 \pm 0,1 \mu\text{m}$, respectivamente, sendo o comprimento total de $48,87 \pm 0,1 \mu\text{m}$. Santos et al. (2014) caracterizaram o espermatozoide apresentando formato fulsiforme e acrossoma com largo segmento apical semelhante ao verificado na chinchila. Ainda, Silva et al. (2013) realizaram a validação da associação sondas fluorescentes iodeto de propídio, diacetato de caboxifluoresceína e Mito trak red®, para avaliação da integridade espermática e Maia et al. (2015), relataram que a água destilada (osmolaridade de de 0 mOsm) seria ideal

para utilizar no teste hiposmótico para verificar a funcionalidade de membrana espermática em preás.

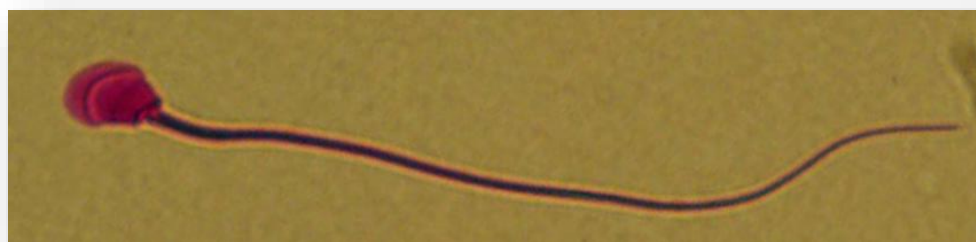


Figura 2: Espermatozoide epididimário de *Galea spixii* (Arquivo Pessoal)

2.1.1. Coleta de espermatozoides epididimários

A coleta dos gametas masculinos pode ser realizada de diversas formas, e dentre elas, a eletroejaculação é o método de escolha para os animais silvestres (CASTELO e SILVA, 2014), porém não há adaptação desse método de coleta para os preás. Desse modo, a coleta de espermatozoide epididimário surge como uma alternativa viável para este propósito, podendo ser utilizada com diversas finalidades, tanto em animais de alto valor genético que vieram a óbito, sendo estes de alto valor genético e espécies ameaçadas de extinção, ou mesmo animais que, por alguma enfermidade, precisem ser esterilizados (MARTINS et al., 2007; MURADÁS, 2007).

A coleta espermática diretamente do epidídimo permite a obtenção de células morfolologicamente viáveis, as quais podem sofrer capacitação, ligar-se à zona pelúcida e fecundar o oócito. O método para sua aplicação pode variar conforme a espécie animal, dependendo da dimensão do epidídimo e da escolha do manipulador (BERTOL et al., 2012), merecendo destaque os métodos da lavagem retrógrada (CARY et al., 2004) e da flutuação (KOZDROWSKI et al., 2011).

A lavagem retrógrada consiste na aplicação de pressão no ducto deferente por meio de uma seringa injetando o diluente. A pressão é aplicada até que todo o conteúdo da cauda seja liberado por meio de uma incisão feita na junção da cauda com o corpo do epidídimo (SILVA et al., 2011). Por outro lado, a flutuação consiste no fatiamento da cauda do epidídimo, imerso em um meio tamponado, sendo os fragmentos deixados nesta

solução por alguns minutos. Com isso, os espermatozoides são liberados diretamente no meio e depois são cuidadosamente recuperados por filtração (CARY et al., 2004). Esses métodos já foram utilizados em animais domésticos, como ovinos (GARDE et al., 1994), caninos (PONGLOWHAPAN et al., 2006) e equinos (HEISE et al., 2010), bem como em roedores silvestres, como cutias (SILVA et al., 2011) e esquilos (PING et al., 2011).

Nos preás, Silva (2013) comparou a eficiência dos métodos de flutuação e lavagem retrógrada para a coleta de espermatozoides de *G. spixii*, utilizando um diluente à base de TES (N-[Tris(hidroximetil)-metil]-2-aminoetanosulfônico). Segundo a autora, não houve diferença na qualidade dos espermatozoides epididimários obtidos pelos dois métodos de coleta (tabela 1).

Tabela 1. Características de espermatozoides epididimários oriundos de preás (*Galea spixii*) (n=9) criados em cativeiro, obtidos por diferentes métodos de coleta (Silva, 2013).

Avaliações	Lav. Retrograda	Flutuação
Viabilidade (%)	56,1 ± 6,1	64,2 ± 4,7
Motilidade (%)	56,1 ± 7,1	72,2 ± 9,1
Vigor (0-5)	2,4 ± 0,4	3,2 ± 0,4
Host (%)	61,5 ± 6,89	51,8 ± 6,26
Nº de espermatozoides (x10⁶)	345,1 ± 86,3	514,8 ± 202,3
Morfolologicamente normais (%)	58,6± 4,8	50,2± 7,4

Após a colheita dos espermatozoides, esses podem ser diretamente utilizados em técnicas reprodutivas como na inseminação artificial (NAKATSUKASA et al., 2001), ou serem conservados por longos períodos por meio da criopreservação (CASTELO et al., 2015). Nesse sentido é importante ressaltar a inexistência de protocolos de criopreservação de espermatozoides de preás.

2.2. CRIOPRESERVAÇÃO DE ESPERMATOZOÍDES EPIDIDIMÁRIOS

O interesse na criopreservação de gametas masculinos vem de décadas atrás, quando foi observado que em temperaturas frias os espermatozoides humanos tornavam-se lentos, chegando ao estado de completa inativação, sendo esse quadro revertido com o aumento da temperatura (CIPRIANO et al., 2013). Em animais, foi reportada pela primeira vez em cães (FOOTE & LEONARD, 1964), e posteriormente adaptado para outras espécies. Contudo, após diversos estudos foi verificado que, para um processo de criopreservação eficiente, as amostras devem ser submetidas à refrigeração, proporcionando um estado de quiescência celular por redução do metabolismo e, assim, diminuindo o gasto energético para finalmente serem armazenadas em nitrogênio líquido (SILVA & GUERRA, 2011). Atualmente a criopreservação vem sendo amplamente utilizada nas espécies domésticas com a finalidade de formar bancos de germoplasma, facilitar o transporte do material genético por longas distâncias, e ainda como ferramenta importante no manejo reprodutivo (RICARTE et al., 2008; DOMINGUES et al., 2011).

Nesse contexto, diversas curvas de congelamento são descritas na literatura, podendo ser classificadas em rápidas (SILVA et al., 2011) e lentas (BARROS et al., 2012), onde estão relacionadas com altas ou baixas taxas de arrefecimento, respectivamente. Em roedores é observado um predomínio no uso das curvas rápidas, como descrito para camundongos (YIDIZ et al., 2007), chinchilas (GRAMAJO-BÜHLER et al., 2011) e cutias (CASTELO et al., 2015). Em cutias, a curva de congelamento consistiu em colocar as amostras diluídas em uma caixa isotérmica por 40 minutos até chegar ao equilíbrio de 15 °C. Em seguida, colocadas em biological oxygen demand incubator (BOD; Q315M26, Quimis, Diadema, Brazil) por 30 minutos para atingir a temperatura de 5°C. Então, cinco minutos após adicionado o crioprotetor, as amostras foram envasadas em palhetas, colocadas em vapor de nitrogênio por um período de cinco minutos e finalmente armazenadas em botijão criobiológico (SILVA et al., 2011).

No entanto, sabe-se que o processo de criopreservação acarreta danos aos espermatozoides devido às mudanças de temperaturas, processo de desidratação, penetração dos crioprotetores na célula, reorganização estrutural dos lipídios e proteínas da membrana, exposição às altas concentrações de solutos e, ainda, a ação dos cristais de gelo, inter e intracelulares (HENRY et al., 2002; SNOECK, 2003). Dessa forma, a curva de congelamento ideal deve ser lenta o suficiente para permitir que os espermatozoides desidratem-se, e rápida o bastante para evitar prolongado período de exposição a altas concentrações de solutos (FISER et al., 1996). Logo, faz-se necessário estabelecer um protocolo de criopreservação

adequado para cada espécie, o que envolve a adequação dos diluentes e crioprotetores, visando à manutenção da qualidade espermática (HU et al., 2009).

2.2.1. Diluente

Os diluentes são soluções constituídas por substâncias que permitem a preservação da membrana espermática, tendo como finalidade básica aumentar o volume da amostra. Assim, a presença de macromoléculas (açúcares, substâncias tamponantes) age estabilizando as membranas e minimizando as perdas de íons e enzimas, mantendo o equilíbrio eletrolítico e osmótico, de modo a inibir o crescimento bacteriano e fornecer energia (JOHNSON et al., 2000; LEVIS et al., 2000).

Nesse contexto, diversos diluentes têm sido utilizados para coleta de espermatozoides diretamente do epidídimo de roedores, o uso do TES foi reportado em chinchilas (PONCE et al., 1998), ratos (VARISLI et al., 2013) e preás (SILVA et al., 2014), e o TRIS em cutias (SILVA et al., 2011) e ratos (VARISLI et al., 2015). Tais soluções têm a finalidade de proteger as células espermáticas, interagindo com o gameta e, assim, preservar a integridade e habilidade de fecundação (CHACUR et al., 2012). Contudo, é necessário que o diluente seja compatível às particularidades espermáticas, como diferenças na composição da membrana de cada espécie, visando diminuir a ocorrência de danos aos espermatozoides (ARAUJO et al., 2013).

2.2.2. Agentes crioprotetores (ACPs)

Aliado ao uso de diluentes, para obter bons resultados na conservação de espermatozoides pelo frio, faz-se necessário à adição de crioprotetores. Os agentes crioprotetores (ACPs) são substâncias que protegem as células durante a redução da temperatura, no intuito de evitar a formação de cristais de gelo e, assim, reduzir danos ao acrossoma e membrana plasmática (CASTRO et al., 2011), podendo ser classificados em extracelular e intracelular conforme sua interação com o espermatozoide. A gema de ovo é classificada como extracelular, pois apresenta alto peso molecular, auxilia na proteção celular por recobrir a superfície da célula e estabilizando a membrana (SOUZA et al., 2014). Dentre os intracelulares destacam-se o glicerol e o dimetilsulfoxido (DMSO), os quais são substâncias de baixo peso molecular, permeáveis à membrana, que atuam

desidratando e reduzindo o ponto de congelação do interior das células, dificultando a formação de cristais de gelo intracelulares (SZTEIN et al., 2001).

O ACP intracelular mais utilizado na criopreservação de espermatozoides de mamíferos é o glicerol, sendo amplamente utilizado em roedores como cutias (SILVA et al., 2011) e ratos (VARSILI et al., 2013). Contudo, o uso de outros crioprotetores tem sido estudado no intuito de avaliar a eficiência e a toxicidade à célula espermática nas mais variadas espécies. Dentre os crioprotetores estudados, o DMSO vem sendo empregado em cutias (CASTELO et al., 2015) e murinos (COOPER et al., 2008). O uso dos ACPs intracelulares em concentrações inadequadas podem apresentar efeitos tóxicos sobre as células espermáticas (ALVARENGA et al., 2000). Logo é necesserário testar diferentes ACPs em diversas concentrações durante o processo de criopreservação, e assim estabelecer o mais eficiente na conservação da qualidade espermática de preás.

2.2.2.1 Glicerol

Atualmente é considerado o crioprotetor universal, sendo descrito como o primeiro crioprotetor intracelular utilizado para espermatozoides (POLGE et al., 1949; BITTENCOURT et al., 2004). O glicerol é quimicamente um álcool, contendo três grupos funcionais de hidroxilas, os quais podem aceitar ligações de moléculas de água evitando assim a formação de cristais de gelo. Ainda, promove a estabilização da membrana durante o processo de criopreservação, através do mecanismo de ligação dos átomos de hidrogênio com os átomos de oxigênio, dos grupos fosfatos dos fosfolipídios da membrana plasmática dos espermatozoides (KUNDU et al., 2000), além de exercer efeito osmótico nas células (OLIVEIRA et al 2013).

O glicerol tem sido empregado com sucesso na criopreservação de espermatozoides epididimários em diversas espécies mamíferas como bovinos (PAPA et al, 2015), ovinos (TAMAYO-CANUL et al 2011) e catetos (BEZERRA et al 2014), e também em roedores como cutias (CASTELO et al 2015), chinchilas (GRAMAJO-BÜHLER et al., 2012) e camundongos (STOREY et al., 1998).

2.2.2.2 Dimetilsulfóxido (DMSO)

O DMSO é um composto químico orgânico de fórmula C_2H_6SO e peso molecular 78 g/mol (FERNANDES et al., 2002), sendo considerado um subproduto da indústria de extração da celulose, facilmente disponível no mercado (CAMICI et al., 2006). O DMSO tem ação na redução da formação de cristais de gelo, por diminuir o ponto de congelação do fluido intracelular, durante o processo de criopreservação, interagindo com os fosfolipídios estruturais da membrana espermática, e assim mantendo a propriedade de transporte de água em temperaturas abaixo de 0°C, (THIRUMALA et al., 2006). Ainda, interage com as membranas, atravessando-as rapidamente por meio de difusão, tendo a capacidade de interagir ou combinar-se com os ácidos nucleicos, carboidratos, lipídeos, proteínas, sem alterar de forma irreversível a configuração molecular, devido a sua rápida penetração celular (SOJKA et al., 1990; YAMAJI et al., 2006). A utilização do DMSO na tentativa de substituir o glicerol na criopreservação de sêmen vem demonstrando bons resultados, principalmente em peixes (SANCHES et al., 2008) e coelhos (ROSATO & IAFFALDANO, 2013).

Diante do exposto, é necessário realizar estudos voltados para a criopreservação, no intuito de obter protocolos eficientes na conservação dos gametas masculinos de preás, visando à obtenção de espermatozoides viáveis após a descongelação, possibilitando assim o armanezameto do material genético por longos períodos.

2.3. AVALIAÇÃO DOS ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMÁRIOS

2.3.1. Avaliação inicial

Parâmetros isolados não são capazes de predizerem a fertilidade dos espermatozoides, sendo necessário avaliar vários aspectos em uma análise multifatorial, para determinar um maior ou menor potencial de fertilidade do macho (SIQUEIRA et al., 2007; ARRUDA et al., 2010). O estabelecimento da qualidade dos gametas masculinos é realizado por diversas avaliações que se baseiam na análise da motilidade, vigor, concentração, morfologia, integridade estrutural e funcional da membrana plasmática (CRESPILHO et al., 2009).

A motilidade espermática consiste em um dos principais parâmetros na avaliação da capacidade fecundante, sendo expressa em percentagem do número total de espermatozoides móveis (ARRUDA et al., 2010). Esta avaliação apresenta a vantagem

de ser de simples realização e não onerosa, porém é considerada subjetiva, sofrendo variação do resultado dependendo do examinador (MEDEIROS, 2003). O vigor expressa a velocidade do movimento do espermatozoide com motilidade progressiva, e segundo com a velocidade do movimento, pode ser classificado de zero a cinco, sendo zero correspondente a ausência de movimento e cinco, ao movimento vigoroso (CBRA, 2013). Ambos os parâmetros, motilidade e vigor, podem ser influenciados por diversos fatores, como diluente (CARVALHO et al., 2008), método de coleta (epididimária, eletroejaculação, vagina artificial) (SILVA et al., 2003), e ainda pelos processos de refrigeração (MOTA FILHO et al., 2013) e congelamento/descongelamento (VALENTE et al., 2010).

Para espermatozoides epididimários, determina-se a concentração total da amostra, onde a quantidade do volume recuperado é multiplicado pela concentração obtida através da leitura na câmara de Neubauer, sendo expressa em 10^6 (milhões), como descrito em preás (SILVA, 2013) e cutias (CASTELO et al., 2015).

A viabilidade espermática é determinada em percentagem de espermatozoides viáveis considerados com a integridade estrutural da membrana. Para essa avaliação usa-se diferentes colorações supravitais, sendo os mais comuns o azul de bromofenol (PEIXOTO et al., 2012), a eosina-nigrosina (BARROS et al., 2012) e o azul de tripan (BEARDEN & FUQUAY, 1992). Ainda, pode ser avaliada por fluoróforos, onde as moléculas fluorescentes utilizadas para o monitoramento da funcionalidade e/ou a integridade das estruturas espermáticas, possuem capacidade de se ligar a pontos específicos das células, permitindo o diagnóstico prático de estruturas espermáticas como a membrana plasmática e as mitocôndrias (CELEGHINI et al., 2010). Para avaliação da viabilidade são comumente utilizados os fluoróforos Hoechst 33258 ou diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) em combinação com Iodeto de Propídio (IP); já para a avaliação da atividade mitocondrial, pode-se utilizar o Mito Tracker red® (CELEGHINI et al., 2010).

A integridade funcional da membrana plasmática da célula espermática é de grande importância para que haja o desencadeamento dos mecanismos fisiológicos envolvidos na fecundação (SIQUEIRA et al., 2007), e para a manutenção e sobrevivência espermática no trato genital feminino (SQUIRES et al., 1999). Para tal avaliação, utiliza-se rotineiramente o teste hiposmótico (HOST), que consiste na exposição do espermatozoide a uma solução de baixa osmolaridade, de modo que haja passagem de água através da membrana espermática, em uma tentativa de atingir o equilíbrio osmótico

entre os compartimentos intra e extracelulares dos espermatozoides bioquimicamente ativos. A osmolaridade usada para avaliação do teste hiposmótico (HOST) varia entre os roedores devido as diferenças interespecíficas do metabolismo e da composição fosfolipídica das membranas (VARISLI et al., 2013). Por exemplo, para a chinchila, é usada uma solução de 100 mOsm/L (PONCE et al., 1998), enquanto que para as cutias, 0 mOsm/L (SILVA et al., 2011).

O estudo da morfologia é realizado para predizer as anormalidades encontradas nos espermatozoides, sendo classificadas conforme a estrutura espermática envolvida como: alterações de cabeça, peça intermediária ou cauda (BLOM, 1950; 1973). Este parâmetro pode ser analisado por meio de esfregaços corados com Rosa de Bengala (SILVA et al., 2011) ou Karras (KANAZAWA et al., 2012) dentre outros corantes. Quando se observa alta frequência de espermatozoides morfologicamente anormais ou alta incidência de um único defeito, a fertilidade pode ser reduzida (ARRUDA et al., 2011). Nesse contexto, a avaliação da morfologia se torna importante nos estudos relacionados à qualidade espermática nos diferentes roedores silvestres na quantificação da percentagem de espermatozoides normais, como já descrita em preás ($58,6 \pm 4,8$) (SILVA, 2013), capivaras ($51,3 \pm 19,42\%$) (RODRIGUEZ et al., 2012) e cutias ($91,9 \pm 1,3 \%$) (SILVA et al., 2011).

2.3.1. Teste de Termorresistência (TTR)

O teste de termorresistência (TTR) foi proposto por Dimitropoulos (1967) para avaliar a fertilidade potencial de sêmen congelado de bovinos, pois, após a cópula os espermatozoides passam por diversas barreiras até chegarem ao seu objetivo, à fecundação do ócito, ou seja, precisam de várias horas após a ejaculação ou inseminação artificial para atingir a ampola na tuba uterina (HAFEZ, 1995). Assim, o tempo de sobrevivência espermática no trato genital feminino está relacionado com seu poder fecundante (MIES FILHO, 1987). Desse modo, o TTR baseia-se na avaliação da longevidade espermática *in vitro*, realizada pelo teste de exaustão dos gametas masculinos, submetidos à temperatura corpórea da fêmea, onde são testados, principalmente, os parâmetros de motilidade e viabilidade dos espermatozoides (BAG et al., 2004).

Posteriormente, o TTR foi utilizado para discriminar o melhor diluente na conservação do sêmen ovino (MAMPOUYA, 1973), e também para verificar a longevidade espermática de tatu-peba coletado por eletroejaculação (SOUSA et al., 2014). De forma geral, a interação do diluente com a célula espermática representa um fator crucial para a preservação da integridade da membrana do espermatozoide (MANJUNATH et al., 2002). Nesse contexto, esse teste pode ser aplicado aos espermatozoides epididimários de preás, no intuito de verificar a longevidade espermática em diferentes diluentes, indicando assim o mais eficiente na colheita e preservação dos parâmetros espermáticos.

2.3.3. Análise Computadorizada de Sêmen (CASA)

No intuito de diminuir a variação na avaliação do movimento espermático, foi desenvolvido um sistema automático (hardware e software), denominado como Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) utilizado para visualizar, digitalizar e analisar imagens sucessivas, fornecendo informações acuradas, precisas e significativas do movimento individual de cada célula, bem como, de subpopulações de células espermáticas (AMANN e KATZ, 2004). Além disso, o sistema permite a análise morfométrica das cabeças dos espermatozoides, proporcionando análises de suas dimensões e avaliação de sua morfologia (RIJSSELAERE et al. 2004).

O primeiro sistema CASA foi descrito por DOTT e FOSTER (1979) há mais de 30 anos, sendo disponível para comercialização em 1985. Nos anos recorrentes foram desenvolvidos outros softwares, porém foi a versão HTM-IVOS 10® proposta para avaliação do sêmen humano (MATOS et al., 2008), que foi validada para espécies animais como camundongos (NEILL e OLDS-CLARKE, 1987) e ratos (CANCEL et al., 2000)

Os parâmetros avaliados pelo CASA são: Velocidade curvilínea (VCL- $\mu\text{m/s}$), considerada a velocidade da trajetória real do espermatozoide, sendo sempre a maior das três velocidades, servindo como elemento de cálculo para a linearidade; Velocidade linear progressiva (VSL- $\mu\text{m/s}$) considerada a velocidade média em função da linha reta estabelecida entre o primeiro e o último ponto da trajetória do espermatozoide, se apresentando sempre como a mais baixa das três velocidades; Velocidade média da trajetória (VAP- $\mu\text{m/s}$) caracterizada como a velocidade de trajetória média do

espermatozoide; Amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH - μm), sendo a amplitude do deslocamento médio da cabeça do espermatozóide em sua trajetória real. (VERSTEGEN et al., 2002).

A mensuração desses parâmetros está relacionada com a capacidade de penetração na zona pelúcida do oócito, sendo a ALH um dos parâmetros que tem maior influência sobre a fertilização. A frequência de batimento flagelar cruzado (BCF- Hz) é o número de vezes que a cabeça do espermatozóide cruza a direção do movimento. A retilinearidade (STR - %) é caracterizada como a relação percentual entre VSL e VAP e a linearidade (LIN - %) estima a proximidade do percurso da célula a uma linha reta.

Assim, as amostras analisadas pelo CASA podem fornecer o conhecimento sobre os padrões cinéticos dos espermatozoides epididimários de preás, visto que, não existe na literatura a descrição de seu uso na espécie em estudo.

2.3.4 Avaliação da cromatina espermática

Durante a espermiogênese ocorre a condensação e organização da cromatina espermática. Neste momento, há substituição da maioria das histonas por proteínas de transição e posteriormente por protaminas (BELETTI, 2013). Esta compactação resulta em maior estabilidade nuclear, diminuindo a susceptibilidade para desnaturação do complexo DNA-proteína, garantindo, assim, a qualidade da cromatina até a fecundação do oócito e a fusão dos genomas, favorecendo o desenvolvimento embrionário e a correta expressão da informação genética (ERENPREISS et al., 2006). Nesse contexto, touros apresentando parâmetros espermáticos como motilidade e morfologia dentro dos padrões aceitáveis, foram considerados subférteis devido a alterações na compactação da cromatina dos espermatozoides (BELETTI E MELLO, 1996). Ainda, foi visto que danos no DNA, mesmo não interferindo na fertilização e no desenvolvimento embrionário inicial *in vitro*, estão diretamente relacionados com a indução da apoptose, após clivagens iniciais (FATEHI et al., 2006).

A avaliação do estado da cromatina, pode ser realizada por diversas metodologias, como a reação de Feulgen, análise estrutural da cromatina espermática – SCSA, microscopia eletrônica, Cromomicina A3 e pelo uso do corante azul de toluidina (BELETTI, 2013). Dentre os métodos para avaliação da cromatina citados, merece

destaque o uso do azul de toluidina, o qual foi proposto por MELLO (1982). Este consiste em um corante catiônico, com fenômeno de metacromasia, com alteração de cor induzida pela ressonância de elétrons entre as moléculas, avaliando a capacidade de moléculas do corante se ligarem aos grupos fosfatos do DNA, estando diretamente relacionado com a compactação do DNA. Logo, o corante azul de toluidina marca os espermatozoides com cromatina descondensada, pois, enquanto a maioria dos grupos fosfatos estão ligados as protaminas, apresentando assim uma cromatina normal, poucas moléculas do corante se ligam ao DNA, e os espermatozoides apresentam coloração azul claro. No entanto, quando há descondensação do DNA, há maior ligação do corante ao DNA, permitindo a ressonância de elétrons entre as moléculas, resultando em uma coloração que varia de azul escuro a magenta. É importante que a solução de azul de toluidina esteja em pH 4,0, pois garante que apenas os fosfatos estejam ionizados e não outros possíveis sítios (ânions) de ligação do corante (BELLETI, 2013).

Este teste foi descrito em cutias apresentando uma média de cromatinas condensadas de $97,5 \pm 0,6\%$ e $96,1 \pm 0,9\%$ para as amostras frescas e descongeladas respectivamente, demonstrando que a criopreservação não prejudicou a condensação da cromatina espermática (CASTELO et al., 2015), contudo o mesmo teste aplicado em espermatozoides de cães demonstrou resultado contrário, obtendo-se $130,66 \pm 73,01$ e $3,5 \pm 0,5$ em amostras frescas e descongeladas (CSERMAK JR, 2011). Assim, o teste de azul de toluidina possibilita a adição de mais um parâmetro na avaliação da qualidade espermática animal. Entretanto, até o presente momento, não existem relatos da aplicabilidade desse teste em préas.

2.3.5. Avaliação da capacidade ligante do espermatozoide

A gema do ovo é rodeada por quatro camadas lipoprotéicas concêntricas, que juntas formam a membrana perivitelínica externa, as quais são denominadas como, membrana vitelínica, espaço vitelínico, membrana perivitelínica, membrana média contínua e capa extravitelínica ou membrana perivitelínica externa (BELLAIRS et al., 1963). Essas membranas são homólogas a zona pelúcida que engloba o oócito nos mamíferos, nas quais estão presentes as glicoproteínas ZP1 e ZP3 (SASANAMI et al., 2007; WACLAWEK et al., 1998).

O teste de ligação do espermatozoide a membrana perivitelina do ovo de galinha vem sendo usado como uma ferramenta para predizer a fertilidade do macho (CORNICI et al., 2012), permitindo uma pequena variação na avaliação de diversos lotes de sêmen, por usar diferentes fragmentos de uma membrana, diminuindo assim o efeito fêmea (CSERMAK JR, 2011). Além disso, pode ser usado na avaliação dos danos causados pelo processo de criopreservação aos espermatozoides (LOSANO et al., 2015; DIAS et al., 2013). Esta técnica é considerada simples, rápida, com material de fácil obtenção e menos dispendiosa que o uso de oócitos (AMORIM et al., 2006; CSERMAK JR, 2011).

Adicionalmente, tal técnica pode identificar a subfertilidade de machos (BARBATO et al., 1998). Seu uso já foi reportado em diversas espécies, como humanos (ROBERTSON & WISHART, 1997), galo (BARBATO et al., 1998), suínos (CORNICI et al., 2012) e caprinos (SANTOS, 2010), bem como em outras espécies apresentadas na tabela 2. Contudo, não há relatos da aplicação dessa técnica para avaliar a capacidade ligante de espermatozoide de preá. Logo sua utilização seria de grande interesse, tendo em vista sua relação com a fertilidade.

Tabela 2. Total de espermatozoides (Média $\pm$ DP) ligados à membrana perivitelina do ovo de galinha, em amostras frescas e descongeladas, de diferentes espécies mamíferas.

Espécie	Amostras Frescos	Amostras Descongeladas	Autor
Cutia	290,1 $\pm$ 26,4 ^{a*}	258,5 $\pm$ 35,6 ^a	CASTELO et al., 2015
Rato Vesper	531,47 $\pm$ 466,8		CORCINI et al., 2011
Gato do mato pequeno	67,57 $\pm$ 48,62	15,6 $\pm$ 10,67	GARAY, 2012
Cão	130,66 $\pm$ 73,01	3,5 $\pm$ 0,5	CSERMAK JR, 2011

*Dados representados em média $\pm$ EP

3. JUSTIFICATIVA

O preá (*Galea spixii* Wagler, 1831), apesar de ter uma população estável, vem decrescendo devido à caça predatória e a destruição de seus habitats. Contudo, pela fácil adaptação desses animais em cativeiro, sua criação apresenta potencial para uso na produção comercial, possibilitando uma fonte de renda local assim como uma alternativa para a preservação da espécie. Ainda, apresentam características para serem utilizados como modelo experimental no desenvolvimento de técnicas de conservação para roedores ameaçados de extinção, como o rato Candango (*Juscelinomys candango*) e o rato do Grande Wilfred (*Wilfredomys oenax*).

Denota-se, no entanto, uma carência de informações quanto aos aspectos reprodutivos da espécie, haja vista que os estudos realizados em machos se limitam à descrição da morfofisiologia do seu sistema reprodutor e espermatogênese. O aprofundamento em tais informações seria crucial para o desenvolvimento de biotécnicas que possibilitem a conservação e multiplicação de seu material genético. Devido à inexistência de protocolos de obtenção de ejaculados em preás, a recuperação de espermatozoides diretamente do epidídimo pode ser considerada uma alternativa viável para obtenção de gametas íntegros do ponto de vista morfológico e funcional.

Dentre os fatores que podem influenciar na qualidade dos espermatozoides epididimários, a solução utilizada na sua recuperação tem vital importância, devendo ser compatível com as particularidades espermáticas de cada espécie. Os diluentes configuram um passo inicial para sua adaptação em protocolos de criopreservação de espermatozoides nestas espécies. Nesse contexto a criopreservação de espermatozoides epididimários de preás pode ser uma alternativa para conservar a viabilidade genética, e ser usada em biotécnicas reprodutivas para melhoria no manejo dessas espécies.

4. HIPÓTESES CIENTÍFICAS

- Os diluentes a base de TES e TRIS são apropriados para recuperação e manutenção da longevidade em espermatozoides epididimários de preá (*Galea spixii*).
- A criopreservação de espermatozoides epididimários de preá pode ser realizada com adição de gema de ovo de galinha associada a glicerol (6%) ou dimetilsufóxido (DMSO – 6%) como crioprotetores externos e internos, respectivamente.

5. OBJETIVOS

5.1. Geral

Estabelecer um protocolo de criopreservação de espermatozoides epididimários de preás (*Galea spixii*).

5.2. Específicos

- Avaliar a longevidade dos espermatozoides epididimários de preá colhidos com diluentes à base de TES e TRIS.
- Verificar o efeito da criopreservação sobre a capacidade dos espermatozoides de preá em se ligarem à membrana perivitelina de ovo de galinha.
- Avaliar a influência da criopreservação sobre a integridade da condensação da cromatina em espermatozoides de preás.
- Avaliar a eficiência dos criopotetores intracelulares glicerol e dimetilsulfoxido (DMSO), em diferentes concentrações, na conservação de espermatozoides epididimários de preás (*Galea spixii*).

6. REFERÊNCIAS

- ALVARENGA, M.A; LANDIM-ALVARENGA, F.C; MOREIRA, R.M; CESARINO, M.M. Acrosomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packaging systems. **Equine Vet J.**, v. 32, p. 541-545, 2000.
- AMANN, R.; KATZ, D.F. Reflections on CASA after 25 years. **J Androl**, v. 25, p. 317-325, 2004.
- AMORIM, E.A.M. **Alteração da membrana espermática de suínos, bovinos e equinos na qualidade do sêmen**. 2008. 174p. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG. 2006.
- ARAÚJO, L.R.S.; DIAS, A.V.; BARROS, T.B.; GUIMARÃES, D.B.; CANTANHÊDE, L.F.; TONIOLLI, R. Adição de betaína ao diluente leite em pó desnatado durante a conservação do sêmen do varrão a 10° C. **Rev. Bras. Ci. Vet.**, v. 20, p. 234-240, 2013.
- ARRUDA, R.L; ORRO, I.R.; PASSOS, T.S.; COSTA E SILVA, E.V.; ZÚCCARI, C.E.S.N. Técnicas para avaliação laboratorial da integridade estrutural e funcional do sêmen congelado de touros. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v. 34, n. 3, p. 168-184, 2010.
- ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; ALONSO, M.A.; CARVALHO, H.F.; OLIVEIRA, L.Z.; NASCIMENTO, J.; SILVA, D.F.; AFFONSO, F.J.; LEMES, K.M.; JAIMES, J.D. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v. 35, n. 2, p. 145-151, 2011.
- BAG, S.; JOSHI, A.; NAQVI, S.M.K.; MITTAL, J.P. Effect of post-thaw incubation on sperm kinematics and acrosomal integrity of ram spermatozoa cryoperserved in medium-sized French straws. **Theriogenology**, v. 62, p. 415-424, 2004.
- BARBATO, G.F.; CRAMER, P.G.; HAMMERSTEDT, R.H. A practical in vitro sperm-egg binding assay that detects subfertiles males. **Biol. Reprod.**, v. 58, p. 686-699, 1998.
- BARROS, M.H.C.; SHIOMI, H.H.; AMORIM, L.S.; GUIMARÃES, S.E.F.; LOPES, P.S.; SIQUEIRA, J.B.; GUIMARÃES, J.D. Criopreservação de sêmen de suíno da raça Piau submetido a três protocolos de congelamento. **R. Bras. Zootec.**, v. 41, n. 4, 2012.

BEARDEN, H.J.; FUQUAY, J.W. **Applied animal reproduction**. New Jersey: PrenticeHall, p. 478, 1992.

BELETTI, M.E. Cromatina espermática: quebrando paradigmas. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v. 37, n. 2, p. 92-96, 2013

BELETTI, M.E.; MELLO, M.L.S. Methodological variants contributing to detection of abnormal DNA-protein complexes in bull spermatozoa. **Braz J Genet**, v. 19, p. 97-103, 1996.

BELLAIRS, R. M.; HARKNESS, M.; HARKNESS, R. D. The vitelline membrane of the hen's egg: a chemical and electron microscopical study, **J. Ultra. Mol. Struct. R.**, v. 8, p. 339-359, 1963.

BERTOL, M.A.F. **Viabilidade de Espermatozóides Bovinos Colhidos de Epidídimos Mantidos em Temperatura Ambiente de 18-20°C**. Dissertação, UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ- Curitiba. 2012

BEZERRA, J.A.B.; SILVA, A.M.; PEIXOTO, G.C.X.; SILVA, M.A.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.R. Influence of Recovery Method and Centrifugation on Epididymal Sperm from Collared Peccaries (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758). **Zool. Sci.** v. 31, p. 338-342, 2014.

BITTENCOURT, R.F.; RIBEIRO, A.L.; SANTOS, A.D.F.; FURST, R.; TEIXEIRA, F.B.S.; CHALHOUB, M.; PORTELA, A.P.; ALVES, S.G.G.; ALMEIDA, A.K.; GUIMARÃES, J.D. utilização de glicerol e etilenoglicol como crioprotetores na congelamento do sêmen caprino. **Ciê. Ani. Bras.** v. 5, n. 1, p. 27-32, 2004.

BJÖRKMAN N, DANTZER V, LEISER R. Comparative placentation in laboratory animals – a review. **Scand. J. Lab. Anim. Sci.**, v. 16, p. 129-58. 1989.

BLOM, E. Ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nord Vet Med.**, v. 25, p. 383-391, 1973.

BLOM, E.A. one-minute live-dead sperm stain by means of Eosin-Nigrosin. **Fertil. Steril.**, v. 1, p. 176-177, 1950.

CAMICI, G.G.; STEFFEL, J.; AKHMEDOV, A.; SCHAFER, N.; BALDINGER, J.; SCHULZ, U.; SHOJAATI, K.; MATTER, C.M.; YANG, Z.; LÜSCHER, T.F.;

- TANNER, F.C. Dimethyl sulfoxide inhibits tissue factor expression, thrombus formation, and vascular smooth muscle cell activation. **Circulation**, v. 114, p. 1512-1521, 2006.
- CANCEL, A.M.; LOBDELL, D.; MENDOLA, P.; PERREAULT, S.D. Objective evaluation of hyperactivated motility in rat spermatozoa using computer-assisted sperm analysis. **Hum. Reprod.**, v. 15, p. 1322-8, 2000.
- CARVALHO, F. P.; SILVA, J. F. S.; SOUZA, G.V.; QUIRINO, C. R.; CARVALHO, C. S. P. Diferentes diluentes sobre a motilidade e integridade de membrana plasmática após o congelamento e descongelamento de sêmen ovino. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, v. 9, n. 3, p. 612-620, 2008.
- CARY, J.A.; MADILL, S.; FARNSWORTH, K.; HAYNA, J.T.; DUOOS, L.; FAHNING, M.L. A comparison of electroejaculation and epididymal sperm collection techniques in stallion. **Can. Vet. J.**, v. 4, p. 35-41, 2004.
- CASTELO, T.S.; SILVA, A.M.; BEZERRA, L.G.; COSTA, C.Y.; LAGO, A.E.; BEZERRA, J.A.; CAMPOS, L.B.; PRAXEDES, E.C.; SILVA, A.R. Comparison among different cryoprotectants for cryopreservation of epididymal sperm from agouti (*Dasyprocta leporina*). **Cryobiology**, v. 71, n. 3, p. 442-7, 2015.
- CASTELO, T.S.; SILVA, A.R. Eletroejaculação em mamíferos silvestres: principais fatores que afetam sua eficiência Electroejaculation in wild mammals: main factors affecting its efficiency. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v. 38, n. 4, p. 208-213, 2014.
- CASTRO, S.V.; CARVALHO, A.A.; SILVA, C.M.G.; FAUSTINO, L.R.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R. Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. **Acta Scient. Veterin.**, v. 39, p. 1-18, 2011.
- CHACUR, M.G.M.; DIAS, H.S.; PAPA, F.O. LOUVISON, B.A.; CALESCO, M.M.; PAPA, P.M. Efeito de meios diluentes na viabilidade de sêmen congelado bovino. **Veterinária e Zootecnia**, v. 19, p. 346-355, 2012.
- CBRA - COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3.ed. Belo Horizonte, 2013. 104 p.
- CELEGHINI, E.C.C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F.; ANDRADE, A.F.C.; ARRUDA, R.P. Simultaneous assessment of plasmatic, acrosomal, and mitochondrial

membranes in ram sperm by fluorescent probes. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 62, n. 3, p. 536-543, 2010.

CIPRIANO, V.T.F; FREITAS, G.C. O impacto da criopreservação na qualidade seminal. **Reprod. Climat.**, v. 28, p. 112-116, 2013.

CORCINI, C.D.; SILVA, B.E.; BRIZOLARA, R.M.R.; GHELLER, S.M.M.; VARELA JUNIOR, A.S.; BONGALHARDO, D.C.; LUCIA, T. JR. Concentração de lactato de cálcio e tempo de incubação sobre a capacidade de adesão e penetração de espermatozoides suínos na membrana perivitelina do ovo da galinha. **Ciênc. Rural**, v. 42, p.142-146, 2012.

CRESPILHO, A.M.; PAPA, F.O.; MARTINS JUNIOR, A.; DELL'AQUA JUNIOR, J.A. Evalulation of frozen bovine semen: How do semen collection and processing centers evaluate the quality of commercialized samples? **Vet Zootec**, v. 16, p. 335-342, 2009.

CSERMAK, JR. A.C. **Uso de sondas fluorescentes e do ensaio de ligação do espermatozoide do cão (*Canis lúpus familiaris*) à membrana perivitelina de ovo de galinha (*Gallus gallus*) como método para predicao da capacidade fertilizante do sêmen**, Viçosa, Brasil. 2011. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2011.

DIAS, J.C.O.; SANTOS, M.C.R.; PENITENTE FILHO, J.M.; OLIVEIRA, G.D.; MENDES, V.R.A.; MANCIO, A.B. Teste de ligação do espermatozoide à membrana perivitelina da gema de ovo após adição de ringer lactato, citrato de sódio 2,92% e solução tris no sêmen caprino descongelado. **Acta Vet. Bras.**, v. 7, p. 300-305, 2013.

DIMITROPOULOS, E. La signification du test de la thermoresistence dans l'appreciation de valeur fécondante du sperme congelé. Meaning of the thermoresistance test for the eval-uation of fertilizing ability of frozen sperm. **Ann. Méd. Vet.**, v. 4, p. 215-24, 1967.

DOMINGUES, S.F.S.; LIMA, J.S.; OLIVEIRA, K.G.; SANTOS, R.R. Biotecnologias de reprodução como uma estratégia complementar à conservação in situ de primatas neotropicais ameaçados de extinção: perspectivas e desafios. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.35, p.124-129, 2011.

DOTT, H.M.; FOSTER, G.C. The estimation of sperm motility in semen, on a membrane slide, by measuring the area change frequency with an image analyzing computer. **J Reprod Fertil**, v. 55, p. 161-166, 1979.

ERENPREISS, J.; SPANO, M.; EREMPREISA, J.; BUNGUM, M.; GIWEREMAN, A. Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. **Asian J. Andrology**, v. 8, p. 11-29, 2006.

FATEHI, A.N.; BEVERS, M.M.; SCHOEVERS, E.; ROELEN, B.A.; COLENBRANDER, B.; GADELLA, B.M. DNA damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages. **J. Androl.**, v.27, p.176-188, 2006

FERNANDES, A. C.; HEROLD, B.; MAIA, H.; RAUTER, A. M.; RODRIGUES, J. A. R. **Guia IUPAC para a nomenclatura de compostos orgânicos**. Lisboa: Lidel, 2002. 220p.

FISER, P.S.; FAIRFULL, R.W.; PANICH, P.L. Glycerol equilibration time revisited. **Reprod. Domest. Anim.**, v. 31, p. 141-146, 1996.

FOOTE, R.H.; BROCKETT, C.C.; KAPROTH, MT. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 71, p. 13-23, 2002.

FOOTE, R.H., LEONARD, E.P. The influence of pH, osmotic pressure, glycine, and glycerol on the survival of dog sperm in buffered-yolk extenders. **Cornell Vet.**, v.54, p.78-89, 1964.

GARAY, R. de M. **Uso de sondas fluorescentes para avaliação seminal de ejaculados de gato do mato pequeno (*Leopardus tigrinus*) e ensaio de ligação à membrana perivitelina de ovo de galinha (*Gallus gallus*) como ferramenta de predição de fertilidade espermática**. Viçosa, Brasil, 2012. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2012

GARDE, J.; AGUADO, M.; PÉREZ, S.; GARRIDO, D.; PÉREZ-GUZMÁN, M.; MONTORO, V. Physiological characteristics of epididymal spermatozoa from postmortem rams. **Theriogenology**, v. 41, p. 203, 1994.

GRAMAJO-BÜHLER, M.C.; PUCCI-ALCAIDE, F.; SÁNCHEZ-TORANZO, G. Effect on sperm quality of different cryoprotectants in sperm of *Chinchilla lanígera*. **Zygote**, v. 21, p. 351-357. 2012.

HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 6. ed. São Paulo: Manole, 1995. 582 p.

HEISE, A.; KÄHN, W.; VOLKMANN, D.H.; THOMPSON, P.N.; GERBER, D. Influence of seminal plasma on fertility of fresh and frozen-thawed stallion epididymal spermatozoa. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 118, p. 48-53, 2010.

HENRY, M.; SNOECK, P.P.N.; COTTORELLO, A.C.P. Post-thaw spermatozoa plasma membrane integrity and motility of stallion semen frozen with different cryoprotectants. **Theriogenology**, v. 58, p. 245-248, 2002.

HU, J.H.; LI, Q.W.; CHEN, Y.L.; JIANG, Z.L.; JIA, Y.H.; WANG, L.Q.; OU, B.B. Effects of addition of vitamin B12 to the extender on post-thaw motility, acrosome morphology, and plasma membrane integrity in bull semen, Turk. **J. Vet. Anim. Sci.**, v. 33, p. 379-384, 2009.

ICMbio (INSTITUTO CHICO MENDES). Livro Vermelho, v.II, **mamíferos I**. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/portal/biodiversidade/fauna-brasileira/lista-de-especies/livro-vermelho>> Acessado em 16 de outubro de 2015.

IUCN (*International Union for Conservation of Nature*). **Red List of Threatened Species**. Version 2014.3. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on **03 May 2015**

JOHNSON, L.A.; WEITZE, K.F.; FISER, P.; MAXWELL, W.M.C. Storage of boar semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 62, p. 143-172, 2000.

KANAZAWA, M.Y.; SCOTT, C.; WILGES, C.H.M.; DIAS, L.G.G.G.; SOUZA, F.F. Correlação da circunferência escrotal, citologia testicular e parâmetros do sêmen do epidídimo de touros. **Enciclop. Biosf.**, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v. 8, n. 15; p. 517, 2012.

KOONJAENAK, S.; PONGPENG, P.; WIROJWUTHIKUL, S.; JOHANNISSON, A.; KUNAVONGKRIT, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Seasonality affects post thaw plasma membrane intactness and sperm velocities in spermatozoa from Thai AI swamp buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v. 67, p. 1424-1435, 2007.

KOZDROWSKI, R.; NIŻAŃSKI, W.; DUBIEL, A.; OLECH, W.; Possibilities of using the European bison (*Bison bonasus*) epididymal spermatozoa collected post-mortem for

cryopreservation and artificial insemination: a pilot study. **Reprod. Biol. Endocrin.**, v. 9, p. 31, 2011.

KUNDU, C.N.; CHAKRABORTY, J.; DUTTA, P.; BHATTACHARYYA, D.; GHOST, A.; MAJUNDER, G.C. Development of a simple sperm cryopreservation model using a chemical defined medium and the goat caudal epididymal spermatozoa. **Cryobiology**, v. 40, p. 117-25, 2000.

LEVIS, D. Liquid boar semen production: current extender technology and where do we go from here. In International Conference on Boar Semen preservation. 4., 2000, Betsville, Maryland USA. Proceedings... **Beltsville** p. 121-128, 2000.

LOOMIS, P. R.; GRAHAM, J. K. Commercial semen freezing: Individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 105, p. 119-128, 2008

LOSANO, J.D.; ANGRIMANI, D.S.; PEREIRA, R.J.; ROCHA, A.M.; CRISCUOLO, T.S.; BARNABE, V.H.; BARNABE, R.C.; MENDES, C.M.; ASSUMPÇÃO, M.E.; NICHI, M. Utilisation of sperm-binding assay combined with computer-assisted sperm analysis to evaluate frozen-thawed bull semen. **Andrology**, v. 47, p. 77-84, 2015.

MAMPOUYA, C. **Etude de la survie et de la fécondance du sperm de béliet après conservation à l'état liquide congelé. 1973.** Thèse Docteur de Troisième Cycle. U.E.R. Sciences Exactes et Naturelles - Université de Clermont - Ferrand, France, 1973.

MANJUNATH, P.; NAUC, V.; BERGERON, A.; MÉNARD, M. Major Proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. **Biol. Reprod.**, v. 67, p. 1250-1258, 2002.

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. **Anim. Reprod. Sci.** v. 101, p. 326-331, 2007.

MATOS, D.L.; ARAÚJO, A.A.; ROBERTO, I.G.; TONIOLLI, R. Análise computadorizada de espermatozoides: revisão de literatura Computer-assisted sperm analysis (CASA): a review. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v. 32, n. 4, p. 225-232, 2008.

MEDEIROS, A.S.L. **Utilização de diferentes tipos de aminas como agentes crioprotetores para espermatozoides de garanhão.** Dissertação de mestrado em

medicina veterinária, Botucatu, SP. Programa de Pós- graduação em Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista. 96f, 2003.

MELLO, M.L.S. Induced metachromasia in bull spermatozoa. **Histochemistry**, v. 74, p. 387-392, 1982.

MENDES, B.V. **Plantas e animais para o nordeste**. Rio de Janeiro: Globo, p.167, 1987.

MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais e inseminação artificial**. 5.ed. Porto Alegre: Sulina, 1982. 783p.

MOREIRA, S.S.J.; SILVA, A.M.; CAMPOS, L.B.; BEZERRA, J.A.B.; OLIVEIRA, M. F.; SILVA, A.R. Avaliação da função da membrana plasmática em espermatozoides epididimários de preás (*Galea spixii* Wagler, 1831) com diferentes soluções hiposmóticas. In: XXI Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 2015, Belo Horizonte. Anais do XXI Congresso Brasileiro de Reprodução Animal. Belo Horizonte: CBRA, 2015. v. 1. p. 263.

MOTA FILHO, A.C.; SILVA, H.V.R.; FREITAS, L.A.; NUNES, T.G.P.; ARAÚJO A.A.; SILVA L.D.M. Refrigeração do epidídimo canino a 4°C e recuperação dos espermatozoides epididimários utilizando ACP-106c12013. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 33, p. 1155-1160, 2013.

MURADÁS, P.R. **Viabilidade e teste de criopreservação de espermatozoide colhido da cauda do epididimo de equino**. 2007, 77 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Curso de Pósgraduação em Ciências Veterinárias, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná- UFRP, Curitiba 2007.

NAKATSUKASA, E.; INOMATA, T.; IKEDA, T.; SHINO, M.; KASHIWAZAKI, N. Generation of live rat offspring by intrauterine insemination with epididymal spermatozoa cryopreserved at -196°C. **Reproduction**, v. 122, p. 463-467, 2001.

NEILL, J.M. & OLDS-CLARKE, P.A computer-assisted assay for mouse sperm hyperactivation demonstrates that bicarbonate but not bovine serum albumin is required. **Gam. Res.**, v. 8 p. 121-140, 1987.

OLIVEIRA, G.C.; OLIVEIRA, B.M.M.; CELEGHINI, E.C.C.; FERNANDES, C.B.; MATTOS, C.B. Criopreservação do sêmen equino: uma revisão Cryopreservation of equine semen: a review. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v. 37, n. 1, p. 23-28, 2013.

- OLIVEIRA, M.F.; MESS, A.; AMBRÓSIO, C.E.; DANTAS, C.A.G.; FAVARON, P.O.; MIGLINO, M.A. Chorioallantoic placentation in *Galea spixii* (Rodentia, Caviomorpha, Caviidae). **Reprod. Biol. Endocrin.**, v. 6, p. 39, 2008.
- PAPA, P.M.; PAPA, F.O.; OLIVEIRA, L.A.; GUASTI, P.N.; CASTILHO, C.; GIOMETTIB, I.C. Different extenders in the cryopreservation of bovine epididymal spermatozoa. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 161, p. 58-63, 2015.
- PEIXOTO, G.C.X.; SILVA, M.A.; CASTELO, T.S.; SILVA, A.M.; BEZERRA, J.A.B.; SOUZA, A.L.P.; OLIVEIRA, .M.F.; SILVA, A.R. Individual variation related to testicular biometry and semen characteristics in collared peccaries (*Tayassu Tajacu* Linnaeus, 1758), **Ani. Reprod. Sci.**, v. 134, p. 191-196, 2012.
- PING, S.; WANG, F.; ZHANG, F.; WU, C.; TANG, W.; LUO, Y.; YANG, S. Cryopreservation of epididymal sperm in tree shrews (*Tupaia belangeri*). **Theriogenology**, v. 76, p. 39-46, 2011.
- POLGE, C.; SMITH, A.U.; PARKES, A.S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, v. 164, p. 666, 1949.
- PONCE, A.A.; AIRES, V.A.; CARRASCOSA, R.; FIOL DE CUNEO, M.; RUIZ, R.D.; LACUARA, J.L. Functional activity of epididymal *Chinchilla kaniger* spermatozoa cryopreserved in different extenders. **Res. Vet. Sci.**, v. 64, p. 239-243, 1998.
- PONGLOWHAPAN, S.; CHATDARONG, K.; SIRIVAIIDYAPONG, S.; LOHACHIT, C. Freezing of epididymal spermatozoa from dogs after cool storage for 2 or 4 days. **Theriogenology**, v. 66, p. 1633-1636, 2006.
- REIS, N.R.; PERACCHI, A.L.; PEDRO, W.A.; LIMA, I.P. **Mamíferos do Brasil**. Editora da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, p. 22-23, 2006.
- RICARTE, A.R.F.; ARAÚJO, S.A.C.; DANTAS, T.V.M.; COSTA, E.C.; SILVA, J.B.A.; TEIXEIRA, M.F.S. Possibilidades de aplicação de biotecnologias reprodutivas em animais de produção acometidos por agentes víricos. **Rev. Bras. Reprod. Ani.**, v.32, n. 1, p. 3-8, 2008.
- RIJSSELAERE, T.; VAN-SOOM, A.; HOFLACK, G.; MAES, D.; KRUIF, A.; Automated sperm morphometry and morphology analysis of canine semen by the Hamilton-Thorne analyzer. **Theriogenology**, v. 62, p. 1292-1306, 2004.

- ROBERTSON, L.; BROWN, H.L.; STAINES, H.J.; WISHART, G.J. Characterization and application of an avian in vitro spermatozoa-egg interaction assay using the inner perivitelline layer from laid chicken eggs. **J. Reprod. Fertil.**, v. 110, p. 205-211, 1997.
- RODRIGUES, M.N.; OLIVEIRA, G.B.; ALBUQUERQUE, J.F.G.; MENEZES, D.J.A.; ASSIS NETO, A.C. MIGLINO, M.A.; OLIVEIRA, M.F. Aspectos anatômicos do aparelho genital masculino de preás adultos (*Galea spixii* Wagler, 1831). **Biotemas**, v. 26, p. 181-188, 2013.
- RODRIGUEZ, J.; PEÑA M.; GÓNGORA, A.; MURILLO, R. Obtención y evaluación del semen de capibara *Hydrochoerus hydrochaeris*. **Rev. MVZ Córdoba**, v. 17, n. 2, p. 2991-2997, 2012.
- ROSATO, M.P.; IAFFALDANO, N. Cryopreservation of rabbit semen: Comparing the effects of different cryoprotectants, cryoprotectant-free vitrification, and the use of albumin plus osmoprotectants on sperm survival and fertility after standard vapor freezing and vitrification. **Theriogenology**, v. 79, p. 508-516, 2013.
- SANCHES, E.G.; OLIVEIRA, I.R.; SERRALHEIRO, P.C.S. Crioconservação do sêmen da garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus*. **Bioikos**, v. 22, p. 81-90, 2008.
- SANTOS, M.C. R. **Métodos alternativos para análises da capacidade de ligação dos espermatozoides caprinos, Viçosa, Brasil, 2010**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Viçosa. 2010.
- SANTOS, P.R.S.; OLIVEIRA, M.F.; ARROYO, M.A.M.; SILVA, A.R.; RICI, R.E.G.; MIGLINO, M.A.; ASSIS NETO, A.C.; Ultrastructure of spermatogenesis in Spix's yellow-toothed cavy (*Galea spixii*). **Reproduction**, v. 147, p. 13-19. 2014.
- SANTOS, P.R.S.; OLIVEIRA, M.F.; MENEZES, D.J.A.; RODRIGUES, M.N.R.; ASSIS, A.C.N. Inicialização do desenvolvimento da puberdade e dos órgãos genitais masculinos de preás (*Galea spixii*) criados em cativeiro, **V Simpósio de Ciências da UNESP – Dracena VI Encontro de Zootecnia – UNESP Dracena**, 2009
- SANTOS, P.R.S.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.R.; ASSIS NETO, A.C; Development of spermatogenesis in captive-bred Spix's yellow-toothed cavy (*Galea spixii*). **Reprod. Fert. Develop.**, v. 24, n. 6, p. 877-85, 2012.
- SASANAMI, T.; MURATA, T.; OHTSUKI, M.; MATSUSHIMA, K.; HYAMA, G.; KANSABU, N.; MORI, M. Induction of sperm acrosome reaction by perivitelline

membrane glycoprotein ZP1 in Japanese quail (*Coturnix japonica*), **J. Reprod. Fertil.**, v. 133, p. 41-49, 2007.

SILVA, A.E.D.F.; DIAS, A.L.; UNANIAN, M.M.; FREITAS, A.R.F.; BLOCH JUNIOR, C. Conteúdo de Peptídeos e Avaliação Morfofisiológica dos Espermatozóides do Epidídimo e Ejaculado de Bovinos. **R. Bras. Zootec.**, v. 32, n. 6, p. 1890-1900, 2003.

SILVA, A.M. **Coleta e caracterização de espermatozoides epididimários de preás (*Galea spixii* Wagler, 1831).** 2013. 44f. Monografia (Graduação) – Graduação em Zootecnia, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, RN, 2013.

SILVA, M.A.; PEIXOTO, G.C.X.; SANTOS, E.A.A.; CASTELO, T.S.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.R. Recovery and cryopreservation of epididymal sperm from agouti (*Dasiprocta aguti*) using powdered coconut water (ACP-109c) and Tris extenders. **Theriogenology**, v. 76, p. 1084-1089, 2011a.

SILVA, S.V.; GUERRA, M.M.P. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v. 35, n. 4, p. 370-384, 2011.

SILVA, A.M.; SOUZA, P.C.; BEZERRA, J.A.B.; SANTOS, E.A.A.; CAMPOS, L.B.; PRAXEDES, E.C.G.; SOUZA, A.L.P.; SILVA, A.R. Validação de Sondas Moleculares Fluorescentes na Avaliação da Viabilidade de Espermatozoides Epididimários de Preá (*Galea spixii* spixii). In: XIX Seminário de Iniciação Científica, 2013, Mossoró. **XIX SEMIC: XIX Seminário de Iniciação Científica**, 2013

SIQUEIRA, J.B.; GUIMARÃES, J.D.; COSTA, E.P.; HENRY, M.; TORRES, C.A.A.; SILVA, M.V.G.B.; SILVEIRA, T.S. Relação da taxa de gestação com sêmen bovino congelado e testes de avaliação espermática in vitro. **Rev. Bras. Zootec.**, v. 36, n. 2, 2007.

SOJKA, E.J.; KIMMICK, S.V.B; CARISON, G.P. Dimethyl sulfoxide update – New applications and dosing methods. **Proc. Am. Assoc. Equine. Pract.**, v. 36, p. 683-690, 1990.

SNOECK, P.P.N. **Aspectos da criopreservação de sêmen eqüino: composição do meio diluidor, curvas de congelamento e fertilidade.** Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 116f, 2003.

SOUZA, A.L.P.; LIMA, G.L.; SILVA, A.R. Alternativas para o aperfeiçoamento dos protocolos de criopreservação de sêmen de animais selvagens. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 38, p. 98-102, 2014.

SOUZA, P.C.; SANTOS, E.A.A.; SILVA, A.M. CASTELO, T.S.; PEIXOTO, G.C.X.; FREITAS, C.I.A.; SILVA, A.R. Viabilidade do sêmen de tatus-peba (*Euphractus sexcinctus*) centrifugado e diluído em Tris ou água de coco em pó Viability of the six-banded armadillos (*Euphractus sexcinctus*) semen centrifuged and extended in Tris or powdered coconut water. **Ciênc. Rural**, v.44, n.9, p.1645-1650, 2014.

SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W.; GRAHAM, J.K.; VANDERWALL, D.K.; MCCUE, P.M.; BRUMMER, J.E. Cooled and frozen stallion semen, Fort Collins: Animal Reproduction Biotechnology Laboratory, Colorado State University, **Bulletin** n. 09, 1999.

SZTEIN, J.M.; NOBLE, K.; FARLEY, J.S.; MOBRAATEN, L.E. Comparison of permeating and nonpermeating cryoprotectants for mouse sperm cryopreservation. **Cryobiology**, v. 482, p. 28-39, 2001.

STOREY, B.T.; NOILES, E.E.; THOMPSON, K.A. Comparison of Glycerol, Other Polyols, Trehalose, and Raffinose to Provide a Defined Cryoprotectant Medium for Mouse Sperm Cryopreservation. **Cryobiology**, v. 37, p. 46-58, 1998.

TAMAYO-CANULA, J.; ALVAREZA, M.E.; LÓPEZ-URUEÑA, A.; NICOLASA, M.; MARTINEZ- PASTORA, F.; ANELA, E.; ANELA, L.; PAZ, P. Undiluted or extended storage of ram epididymal spermatozoa as alternatives to refrigerating the whole epididymes. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 126, p. 76-82, 2011.

TARABORELLI, P.; MORENO, P. Comparing composition of social groups, mating system and social behavior in two populations of *Microcavia australis*. **Mamm. Biol.**, v. 74, p. 15-24, 2009.

THIRUMALA, S.; CAMPBELL, W. T.; VICKNAIR, M. R.; TIERSCH, T. R.; DEVIREDDY, R. V.; Freezing response and optimal cooling rates for cryopreserving sperm cells of striped bass, *Morone saxatilis*. **Theriogenology**, v. 66, p. 964-973, 2006.

VALENTE, S.S.; PEREIRA, R.M.; BAPTISTA, M.C.; MARQUES, C.C.; VASQUES, M.I.; SILVA PEREIRA, M.V.C.; HORTA, A.E.M.; BARBAS, J.P. In vitro and in vivo

fertility of ram semen cryopreserved in different extenders. *Anim. Reprod. Sci.*, v.117, p.74-77, 2010.

VARISLI, O.; SCOTT, H.; AGCA, C.; AGCA, Y. The effects of cooling rates and type of freezing extenders on cryosurvival of rat sperm. *Cryobiology*, v. 67, p. 109-16, 2013.

VARISLI, O.; AGCA, C.; AGCA, Y. Influence of extenders and cooling rates on epididymal sperm of Lewis rat strain. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.*, v. 62, p. 57-62, 2015.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, v. 57, p. 149-179, 2002.

WACLAWEK, M.; FOISNER, R.; NIMPF, J.; SCHNEIDER, W.J. The chicken homologue of zona pellucida protein-3 is synthesized by granulosa cells, *Biol. Reprod.*, v. 59, p. 1230-1239, 1998.

YILDIZ, C.; TTAVIANI, P.; L.A.W., N.; AYEARST, R.; L.I.U., L.; MCKERLIE, C. Effects of cryopreservation on sperm quality, nuclear DNA integrity, in vitro fertilization, and in vitro embryo development in the mouse. *Reproduction*, v. 133, p. 585-595, 2007.

YAMAJI, Y.; VALDEZ, JR. D.M.; SEKI, S.; YAZAWA, K.; URAKAWA, C.; JIN, B.; KASAI, M.; KLEINHANS, F.W.; EDASHIGE, K. Cryoprotectant permeability of aquaporin-3 expressed in *Xenopus* oocytes. *Cryobiology*, v. 53, p. 258-267, 2006.

CAPÍTULO 1 - EFEITO DE DIFERENTES DILUENTES NA QUALIDADE DE ESPERMATOZOIDES RECUPERADOS DOS EPIDÍDIMOS DE PREÁS (*Galea Spixii*)

Andréia Maria da Silva¹, Patrícia Cunha de Souza¹, Livia Batista Campos¹, José Artur Brilhante Bezerra¹, Arthur Emmanuel de Araújo Lago, Moacir Franco de Oliveira¹, Alexandre Rodrigues Silva¹

¹Laboratory of Animal Germplasm Conservation (LCGA), Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró, RN, Brazil; ²Laboratory of Animal Biotechnology, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró, RN, Brazil

*Corresponding author: Laboratory of Animal Germplasm Conservation (LCGA), Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró, RN, Brazil. Tel.: +55 84 3317 8374

E-mail address: legio2000@yahoo.com (A.R. Silva).

Submetido à Revista Ciência Animal 20/01/2015

**Effect of different extenders on the quality of sperm recovered from the
Spix's yellow-toothed caviés (*Galea spixii* Wagler, 1831) epididymides**

(Efeito de diferentes diluentes na qualidade de espermatozoides recuperados dos
epidídimos de preás de dentes-amarelos de Spix (*Galea spixii* Wagler, 1831))

**Andréia Maria da Silva¹, Patrícia Cunha de Souza¹, Livia Batista Campos¹,
José Artur Brilhante Bezerra¹, Arthur Emmanuel de Araújo Lago, Moacir
Franco de Oliveira¹, Alexandre Rodrigues Silva¹**

Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal – LCGA, Universidade Federal
Rural do Semi-Árido – UFERSA, Mossoró, RN, Brazil. E-mail: legio2000@yahoo.com

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the performance of caviés (*G. spixii*) epididymal sperm added to TES or TRIS extenders through a thermal resistance test (TRT), as well as use the fluorescence analysis as a complementary method to predict the viability of these gametes. Nine testicle-epididymis complexes were used for sperm collection by a flotation method. The epididymis tails were sliced and one of them was immersed in 3 mL of TRIS buffer, and the other in 3 mL of TES, for 5 min. After sperm recovery, the samples were subjected to a TTR, being kept in water bath at 37 °C for 3 h. The samples were incubated and the parameters assessed in intervals of 0, 15, 30, 60, 90, 120, 150 and 180 min. The results indicate that TRIS diluent is more efficient than TES ($P < 0.05$) for the maintenance of sperm parameters of Spix's yellow-toothed caviés during the whole TTR, maintaining sperm longevity for an extended time. In conclusion, we indicate the

use of TRIS diluent for recovery and longevity maintenance of epididymal sperm of
cavies (*Galea spixii*).

Keywords: Rodents, Wildlife, Sperm analysis, Thermal resistance, Fluorescent probe.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar o desempenho dos espermatozoides epididimários de preás (*G. spixii*) submetidos aos diluentes TES e TRIS através do teste de termorresistência, bem como utilizar a análise por fluorescência como método complementar para predizer a Integridade da membrana desses gametas. Para tanto foram utilizados 9 complexos testículo-epidídimo para coleta dos espermatozoides que foi feita pelo método de flutuação. Na qual os epidídimos tiveram as caudas fatiadas, das quais, uma foi imersa em 3 mL de tampão Tris, e a outra, em 3 mL de Tes, por cinco minutos. Após a recuperação dos espermatozoides, estes foram submetidos ao TTR no qual foram mantidos em banho-maria a 37 °C durante 3 horas. As amostras foram incubadas e os parâmetros avaliados em intervalos de 0, 15, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos de incubação. Os resultados indicam que o diluente Tris foi mais eficiente que o Tes ($P < 0,05$) quanto a manutenção dos parâmetros espermáticos de preás em todos os momentos de avaliação durante o TTR, possibilitando, inclusive, uma longevidade por um período mais extenso. Em conclusão, indica-se o uso do diluente Tris para a recuperação e a manutenção da longevidade de espermatozoides epididimários de preás (*Galea spixii*).

Palavras-chave: Roedores, Vida selvagem, Análise espermática, Termorresistência, Sonda fluorescente.

1. Introduction

Currently, the population of Spix's yellow toothed-cavy (*Galea spixii* Wagler, 1831) in nature is considered stable (IUCN, 2015), and its captive breeding has been stimulated for meat production (OLIVEIRA et al., 2010). Besides, this animal presents a potential to be used as an experimental model for the development of techniques for the conservation of endangered rodents, such as the Candango mouse (*Juscelinomys candango*) and the Greater Wilfred mouse (*Wilfredomys oenax*).

Studies regarding the reproductive aspects of male cavies are limited to morphological and physiological description of its reproductive system (RODRIGUES et al 2013) and spermatogenesis (SANTOS et al., 2013a). Due to the absence of electroejaculation protocols in cavies, the recovery of spermatozoa directly from the epididymis cauda could be considered as a feasible alternative to obtain viable gametes (MARTINS et al., 2007).

Among the variables that can affect the quality of epididymal sperm, the solution used for the sperm recovery has a fundamental importance and must be compatible with the species spermatoc particularities. When processing rodents' epididymal sperm, extenders based in TES (PONCE, et al., 1998; VARISLI et al., 2013) and TRIS (SILVA et al., 2011) are used for different conservative proposals. It is important to highlight that the evaluation of these solutions represent the initial step on the development of a cryopreservation protocol. Thus, the present study aimed to evaluate the performance of *G. spixii* epididymal sperm added to TES or TRIS extenders through a thermal resistance test (TRT), as well as use the fluorescence analysis as a complementary method to predict the viability of these gametes.

2. Material and Methods

The ethics committee of UFERSA approved the experimental protocols, as well as the animal care procedures used (Process nº 13/2013). The study was conducted at Center of Multiplication of Wild Animals from UFERSA (IBAMA register nº 14.492.004), located in Mossoró, RN, Brazil (5°10'S, 37°10'W). Nine healthy, mature, male Spix's yellow-toothed caviés, with an average age of 2 years, were used. They were maintained under a natural photoperiod (approximately 12 h), sheltered in covered paddocks (3 × 3 m). The animals were fed with fruits and tubers. Fresh drink water was available *ad libitum*.

The animals were pre-medicated with an intramuscular administration of ketamine hydrochloride (15mg.kg⁻¹; Ketalar®; Pfizer, São Paulo, Brazil) and xylazine hydrochloride (1mg.kg⁻¹; Rompun®; Bayer, São Paulo, Brazil). After 15 min, anesthesia was induced with intravenous administration of sodium thiopental (50mg.kg⁻¹; Thiopentax®; Cristalia, São Paulo, Brazil), and the animals were subsequently euthanized with intravenous potassium chloride (2.56 mEq.kg⁻¹; Revitec®; Halexstar, São Paulo, Brazil) (VALE et al., 2013). Immediately thereafter, there was opening of the abdomen and recovery of the testicles-epididymis-vas deferens complexes. These were covered with gauze humidified with physiological saline solution (NaCl 0.9%), stored in an isothermal box, and transported to the laboratory at room temperature. Sperm recovery was performed by the flotation method (PONCE et al., 1998), where the epididymis was sliced and immersed in 2.5 mL of one of the extenders tested. For each animal, epididymis cauda were randomly submitted to sperm recovery using a TES-based extender [4.9-g Tris-hydroxymethyl-aminomethane, 1.06-g N-[Tris(hydroxymethyl)methyl]-2-aminoethanesulfonic acid and 0.2-g D-fructose dissolved in 100 mL of ultrapure water (TES; 327 mOsm/L and pH 7.2)] (VARISLI et al., 2013), or TRIS-based extender [3.028-g Tris-hydroxymethyl-aminomethane, 1.78-g monohydrated citric acid, and 1.25-g D-

fructose dissolved in 100 mL of ultrapure water (Tris; 295 mOsm/L and pH 6.8)] (SILVA et al., 2011). After 5 min in static position, the sperm suspension was separated from epididymis fragments using a micropipette (SILVA et al., 2011).

The number of recovered sperm was calculated by the multiplication of sperm concentration, obtained through the Neubauer counting chamber, and the recovered volume. The motility (percentage of motile sperm) and vigor (strength of sperm flagellum beating on a 0 to 5 scale) were assessed using light microscopy (Eclipse E200, Nikon, Melville, NY, USA) at $\times 100$ and $\times 400$ magnification. Bengal rose smears were prepared to evaluate sperm morphology, counting 200 cells/slide, under light microscopy ($\times 1000$) (SILVA et al., 2011). A hypo-osmotic swelling test was performed to assess sperm membrane functionality, using a fructose solution at 100 mOsm/L (PONCE et al., 1998).

To evaluate plasma membrane integrity and mitochondrial activity of sperm, an aliquot (10 μ L) containing sperm was incubated at 37 °C for 10 min in a solution composed by the association of 2 μ L of propidium iodide (PI, Sigma-Aldrich, Co., St Louis, MO, USA), 5 μ L of CMXRos (Mito Tracker red[®], Molecular Probes, M-7512) and 3 μ L Hoechst 342 (H-342; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Samples were evaluated in an epifluorescence microscope ($\times 400$; Leica, Kista, Sweden) by counting 200 cells. Sperm stained in blue (H-342) were classified as having intact sperm membrane, and those fully or partially stained in red (PI) were classified as not intact. Cells with midpiece marked in yellow were classified as showing mitochondrial activity.

To evaluate sperm longevity, a thermal resistance test (TRT) was conducted (EMERICK et al., 2011). Samples were maintained in a water bath at 37 °C for 3 h. Sperm parameters previously mentioned were evaluated immediately after recovery (time 0) and at 15, 30, 60, 90, 120, 150 and 180 minutes, except sperm morphology, which was analyzed at time 0 and at 60 min intervals.

The results were expressed as mean $\pm$ SEM, analyzed with the software Sigmastat 3.5 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA). Data were checked for normality by the Shapiro–Wilk test and for homoscedasticity by Levene’s test. The results were submitted to angular transformation when necessary. The effect of the extender on sperm parameters was verified by the Fisher PLSD test. Comparisons along the time were assessed by ANOVA for repeated measures ($P < 0.05$). The vigor was evaluated by the Mann-Whitney test ($P < 0.05$).

3. Results

A total of $207.3 \pm 44.9 \times 10^6$ sperm were recovered when TES was used, while $250.2 \pm 47.4 \times 10^6$ sperm were recovered at using Tris ($P < 0.05$). Immediately after the recovery (time 0, Figure 1), samples diluted in TRIS presented better motility, vigor, membrane integrity and mitochondrial activity than those recovered in TES ($P < 0.05$). No differences were observed regarding the membrane functionality ($P > 0.05$).

During the TRT, the motility (Figure 1A) and the vigor (Figure 1B) were better preserved at using TRIS instead of TES ($P < 0.05$). However, the motility declined at 60 min after the beginning of the test, and the vigor after 30 min, in both extenders tested ($P < 0.05$). As for the preservation of membrane integrity and mitochondrial activity, TRIS provided higher values than TES (Figure 1CE). Although sperm recovered with TES were immotile at 30 min, this extender promoted higher values for membrane functionality (Figure 1D) than TRIS ($P < 0.05$) along the TRT. It was noted that sperm morphology (Table 1) was less damaged along the TRT in the TRIS than TES samples ($P < 0.05$). Among the morphological defects observed, tail defects such as coiled and bent coiled tail were more predominant, especially when TES was used.

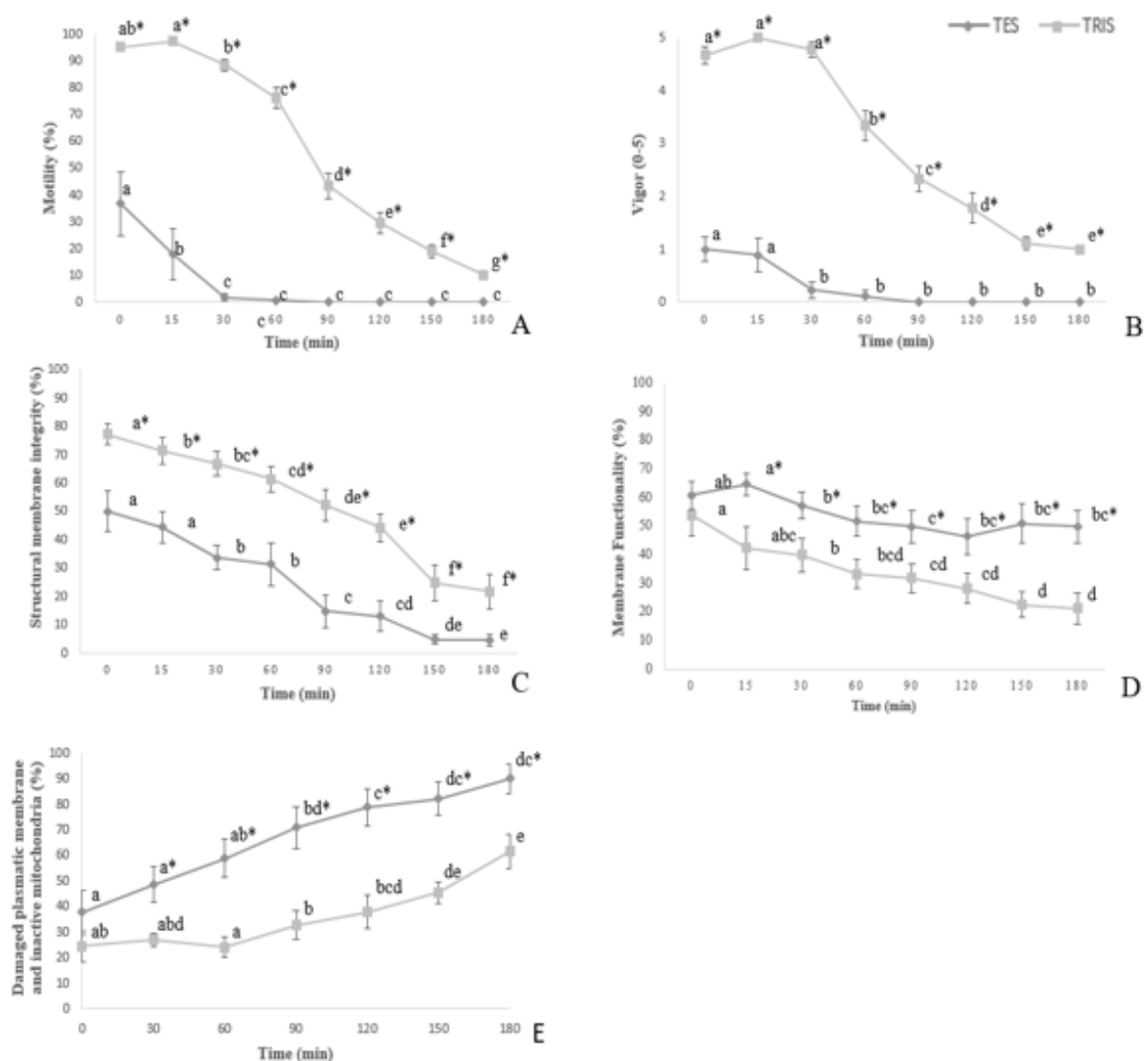


Figure 1. Values (Mean $\pm$ SEM) of motility (A), vigor (B), structural membrane integrity (C), membrane functionality (D), damaged plasmatic membrane and inactive mitochondria (E) from Spix's yellow-toothed cavy epididymal sperm (n =9) during the thermal resistance test (TRT) using TES-based and TRIS-based extenders.

* Superscripts indicate values with significant difference between experimental groups in each time (P < 0.05). ^{a,b,c,d,e} Lowercase letters superscripts indicate values with significant difference in the same experimental group throughout the time (P < 0.05).

Table 1. Morphological characteristics (Mean $\pm$ SEM) of Spix's yellow-toothed cavy epididymal sperm (n = 9), recovered with TES or TRIS, and submitted to a thermal resistance test (TRT) for 180 minutes.

Morphological characteristics (%)	Time 0		Time 60		Time 120		Time 180	
	TES	TRIS	TES	TRIS	TES	TRIS	TES	TRIS
Normal sperm*	59.9 $\pm$ 3.9 ^b	87.4 $\pm$ 1.8 ^a	38.6 $\pm$ 5.3 ^b	83.7 $\pm$ 2.4 ^a	36.4 $\pm$ 5.5 ^b	81.7 $\pm$ 1.4 ^a	31.8 $\pm$ 8.2 ^b	80.5 $\pm$ 1.8 ^a
Abnormal sperm	50.8 $\pm$ 4.0 ^a	14.4 $\pm$ 1.5 ^b	61.4 $\pm$ 5.2 ^a	16.3 $\pm$ 2.4 ^b	63.6 $\pm$ 16.3 ^a	18.3 $\pm$ 1.4 ^b	68.2 $\pm$ 8.1 ^a	19.5 $\pm$ 1.8 ^a
Distal droplets*	1.7 $\pm$ 0.6	0.5 $\pm$ 0.0	0.5 $\pm$ 0.0	2.0 $\pm$ 0.0	0	1.2 $\pm$ 0.2	0.0	0
Proximal droplets*	0.0	0.7 $\pm$ 0.2	1.2 $\pm$ 0.7	0.7 $\pm$ 0.2	0.5 $\pm$ 0.0	0.0	0.50 $\pm$ 0.0	1.0 $\pm$ 0.0
Tail defects	37.2 $\pm$ 4.0 ^{ba}	11.2 $\pm$ 1.6 ^{aA}	58.5 $\pm$ 5.8 ^{bB}	12.4 $\pm$ 1.9 ^{aAB}	61.4 $\pm$ 5.4 ^{bB}	15.3 $\pm$ 1.7 ^{aAB}	51.8 $\pm$ 1.6 ^{bB}	17.5 $\pm$ 1.7 ^{aB}
Midpiece defects*	1.4 $\pm$ 0.3	2.1 $\pm$ 0.8	2.5 $\pm$ 1.4	1.4 $\pm$ 0.3	1.7 $\pm$ 0.6	1.5 $\pm$ 0.3	0.8 $\pm$ 0.2	1.2 $\pm$ 0.3
Head defects*	1.4 $\pm$ 0.4	0.8 $\pm$ 0.2	1.4 $\pm$ 0.5	3.4 $\pm$ 1.9	1.7 $\pm$ 0.7	1.7 $\pm$ 0.6	1.0 $\pm$ 0.2	1.8 $\pm$ 0.8
Normal acrosome*	72.2 $\pm$ 2.4 ^b	87.3 $\pm$ 1.8 ^a	70.5 $\pm$ 3.9 ^b	86.6 $\pm$ 3.3 ^a	67.1 $\pm$ 5.6 ^b	82.1 $\pm$ 2.5 ^a	67.7 $\pm$ 5.3 ^b	87.7 $\pm$ 1.9 ^a

^{ab} Lowercase letters superscripts indicate significant difference between experimental groups in the same time. (P < 0.05);

^{AB} Uppercase letters superscripts indicate significant difference in each group throughout the time (P < 0.05);

* Superscripts indicate values with no significant difference in the experimental group throughout the time (P < 0.05).

4. Discussion

To the best of our knowledge, this is the first study to evaluate the effect of different extenders on qualitative parameters, along the time, of spix's yellow-toothed caviés epididymal sperm (*G. spixii*). TES and TRIS are buffer substances employed to maintain the ionic equilibrium and the pH of the extender, since the sperm metabolic activity increases the concentration of hydrogen ion, acidifying the medium, hence reducing the sperm longevity and fertilizing capacity (ENGLAND, 1993). In *G. spixii*, the extender that promoted a better maintenance of epididymal sperm parameters was TRIS, which facilitates the preservation of sperm energy by reducing fructose metabolism (RODRIGUES, 1997). Besides, the citric acid, which compose the extender, acts similarly to antioxidants normally present in the seminal plasma, protecting the gametes of high levels of reactive oxygen species (ROS) and lipid peroxidation (SILVA et al., 2006), since epididymal sperm have a low oxidative protection (SIKKA, 2004). In fact, TRIS-based extender was already efficiently used to recover and conserve epididymal sperm from other rodent species, such as the agouti (SILVA et al., 2011).

On the other hand, TES-based extender was considered efficient in the conservation of epididymal sperm from chinchilla (PONCE et al., 1998) and rats (VARISLI et al., 2013), differing from the results obtained in caviés. The negative action of TES ($(\text{HOCH}_2)_3\text{C}^+\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$) on cavy sperm is likely related to its incapacity of capturing the hydroxyl radicals ($\text{OH}^\cdot$), considered the most active ROS in biologic systems (MAIA et al., 2009). It is known that the SO_3^- group from TES acts on H^+ bond, but does not have chelating action on the capture of $\text{OH}^\cdot$. Nevertheless, TRIS ($(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_3^+$) has a greater affinity on anions capture, and the addition of antioxidants to the extender composition helps the inhibition of ROS, resulting in better sperm conservation. Furthermore, the maintenance of samples on temperatures close to

35 °C leads to a greater energy depletion, due to an increase on sperm metabolism (VARISLI et al., 2015), and it is important to emphasize that the TRIS-based extender presents six fold energy sources than the TES-based extender.

The combined use of fluorophores was previously described for bovines (CELEGHINI et al., 2010), and allows a simultaneous evaluation of sperm membrane integrity and mitochondrial activity. Thus, the present study is also the first at using fluorophores on the evaluation of sperm plasma membrane and mitochondria in cavies. The mitochondrial activity declined along the time in the samples using both extenders in a similar way.

Despite TRIS showing superiority on the preservation of most parameters assessed, TES was more effective in conserving sperm membrane functionality. However, we cannot rule out the hypothesis that the hypo-osmotic solution used might be inappropriate for cavy sperm. According Santos et al. (2013b), the solution used in this test should be adequate for the studied species, since the composition of sperm plasma membrane is species-specific. Yet, an interaction between the extender and the hypo-osmotic solution might occur, causing changes on final osmolality, hence interfering on the assay result. For cavies, the hypo-osmotic solution used was similar to that described for another rodent species, the chinchilla – 100 mOsm/L, but the recovery of epididymal sperm was conducted at using Tyrode's solution (PONCE et al., 1998). Although these species belong to the same order, Rodentia, it is known that the extender can influence the test result, in association with variations on plasma membrane composition and physiology, and intracellular components observed among different species (HOLT, 2000). In addition, the membrane functionality test consists in the use of an ideal hypo-osmotic solution, which should exert a sufficient osmotic stress to cause a noticeable volume increase, without promoting sperm lysis. Since the ideal hypo-osmotic solution

varies according to the species (FONSECS et al., 2005), it is necessary to evaluate different solutions to assess the sperm membrane functionality of cavies in the future.

It was also observed that TRIS provided a more effective preservation of cavies' sperm morphology than TES during the TRT. The tail defects were the most prevalent, corroborating to the results reported for agoutis (*Dasyprocta aguti*) (FERRAZ et al, 2011). The predominance of these defects on TES-samples might be associated to the inefficiency of this extender in protecting sperm membrane, exposing the cell to thermal shock, which leads to tail coiling.

In conclusion, the TRIS-based extender is the most indicated for *G. spixii* epididymal sperm recovery. This initial step serves as a basis to determine the most efficient extender to be used for cryoconservative proposals, aiming the formation of a germplasm bank. These results will also contribute to the development of sperm conservation technologies for other endangered rodent species from the same genus.

REFERENCES

CELEGHINI, E.C.C. et al. Simultaneous assessment of plasmatic, acrosomal, and mitochondrial membranes in ram sperm by fluorescent probes. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, v.62, p.536-543, Jun. 2010. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352010000300006>>. Accessed: Nov. 20, 2015. doi:10.1590/S0102-09352010000300006.

EMERICK L.L., et al. Avaliação de integridade de membrana de espermatozoides bovino criopreservado para prever o índice de prenhez. **Ciência Animal. Brasileira**, v.12, p.536-546, 2011. Available from: <<http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/view/9739/9713>> Accessed: Set. 20, 2015. doi: 10.5216/cab.v12i3.9739.

238 ENGLAND, G.C. Cryopreservation of dog semen: a review. **Jounal Reproduction**
 239 **Fertility**. v.47, p.243-255, 1993. Available from:
 240 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8229932>>. Accessed: Nov. 20, 2015.

241 FERRAZ, M.S. et al. Collection and evaluation of epididymal sperm in captive agoutis
 242 (*Dasyprocta aguti*). **Theriogenology**, v.75, p.459-62, Feb. 2011. Available from:
 243 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21040962>>. Accessed: Dez. 20, 2015.
 244 doi:10.1016/j.theriogenology.2010.09.013.

245 FONSECA, J.F. et al. The hypoosmotic swelling test in fresh goat spermatozoa. **Animal**
 246 **Reproduction**, v.2, p.139-144, Apr/June. 2005. Available from:
 247 <<http://www.researchgate.net/publication/267683023>>. Accessed: Nov. 20, 2015.

248 HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and
 249 individual differences. **Theriogenology**, v.53, p.47-58, 2000. Available from:
 250 <[http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00239-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00239-3)>. Accessed: Oct. 23, 2015.

251 IUCN 2015. IUCN **Red List of Threatened Species**. Version 2008.
 252 <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 22 september 2015.

253 MAIA, M.S. et al. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos:
 254 uma revisão. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.33, p.183-193, Oct./Dez. 2009.
 255 Available <http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/pag183-193.pdf>.
 256 Accessed: Oct. 20, 2015.

257 MARTINS, M.I.M. Perspectivas da aplicação comercial de biotecnologias envolvendo
 258 espermatozoides obtidos de epidídimo de cães e gatos. **Revista Brasileira Reprodução**
 259 **Animal**, v.31, p.115-118, Jan./Mar. 2007. Available from: <www.cbra.org.br>
 260 Accessed: Nov. 22, 2015.

261 OLIVEIRA, G.B. et al. Origem e distribuição dos nervos isquiáticos do preá. **Ciência**
 262 **Rural**, v.40, p.1741-1745, Aug. 2010, Available from:
 263 <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782010005000133>>. Accessed: Nov. 20, 2015.
 264 doi:10.1590/S0103-84782010005000133.

265 PONCE, A. A. et al. Functional activity of epididymal Chinchilla kaniger spermatozoa
 266 cryopreserved in different extenders. **Research in Veterinary Science**, v.64, p.239-243,
 267 May./June. 1998. Available from: <<http://europepmc.org/abstract/MED/9690610>>.
 268 Accessed: Nov. 23, 2015. doi:10.1016/S0034-5288(98)90132-1.

269 RODRIGUES, B.A. **Efeito do diluidor à base de albumina sérica bovina (BSA) sobre**
 270 **a viabilidade in vitro do sêmen canino criopreservado**. 1997. 176p. Dissertação
 271 (Mestrado em Medicina Veterinária) – Curso de pós-graduação em Ciências Veterinária,
 272 Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

273 RODRIGUES, M.N. et al. Aspectos anatômicos do aparelho genital masculino de preás
 274 adultos (*Galea spixii* Wagler, 1831). **Biotemas**, v.26, p.181-188, Mar. 2013. Available
 275 from: <[https://periodicos.ufsc.br/index.php/biotemas/article/view/2175-](https://periodicos.ufsc.br/index.php/biotemas/article/view/2175-7925.2013v26n1p181)
 276 [7925.2013v26n1p181](https://periodicos.ufsc.br/index.php/biotemas/article/view/2175-7925.2013v26n1p181)>. Accessed: Nov. 20, 2015. doi:10.5007/2175-
 277 [7925.2013v26n1p181](https://periodicos.ufsc.br/index.php/biotemas/article/view/2175-7925.2013v26n1p181).

278 SANTOS, P.R.S. et al (a). Ultrastructure of spermatogenesis in Spix's yellow-toothed
 279 cavy (*Galea spixii*). **Reproduction**, v.16, p.13-9, Nov. 2013. Available from:
 280 <<http://www.reproduction-online.org/content/147/1/13.long>>. Accessed: Oct. 19, 2015.
 281 doi:10.1530/REP-13-0452.

282 SANTOS, E.A.A. et al (b). Establishing the hypoosmotic swelling test for sperm analysis
 283 in collared peccaries (*Pecari tajacu*). **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária**
 284 **Zootecnia**, v.65, p.1257-1260, Aug. 2013. Available from:

285 <<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352013000400044>>. Accessed: Nov. 20, 2015.
 286 doi:10.1590/S0102-09352013000400044.

287 SIKKA, S.C. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted
 288 reproductive technology. **Journal of Andrology**, v.25, p.5-18, Jan/Feb. 2004. Available
 289 from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14662779>>. Accessed: Dec. 02, 2015.
 290 doi:10.1002/j.1939-4640.2004.tb02751.

291 SILVA, M.A. et al. Recovery and cryopreservation of epididymal sperm from agouti
 292 (*Dasiprocta aguti*) using powdered coconut water (ACP-109c) and Tris extenders.
 293 **Theriogenology**, v.76, p.1084–1089, Oct. 2011. Available from:
 294 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21719083>>. Accessed: Oct. 12, 2015.
 295 doi:10.1016/j.theriogenology.2011.05.014.

296 SILVA, P.F.; GADELLA, B.M. Detection of damage in mammalian sperm cells.
 297 **Theriogenology**, v.15, p.958-978, Oct. 2006. Available from:
 298 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16242762>>. Accessed: Nov. 20, 2015.
 299 doi:10.1016/j.theriogenology.2005.09.010.

300 VALE, A.M.; et al. Dinâmica da inversão do saco vitelino em preás (*Galea spixii* Wagler,
 301 1831). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, p.1033-1040, Aug. 2013. Available from:
 302 <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100736X2013000800014>.
 303 Accessed: Nov. 20, 2015. doi:10.1590/S0100-736X2013000800014.

304 VARISLI, O., et al. Influence of extenders and cooling rates on epididymal sperm of
 305 Lewis rat strain. **Ankara Üniv Vet Fak Derg**, v.62, p.57-62, Jan. 2015. Available from:
 306 < <http://dergiler.ankara.edu.tr/dergiler/11/1952/20425.pdf>> Accessed: Nov. 20, 2015.
 307 doi: 10.1501/Vetfak_00000002658.

308 VARISLI, O. et al. The effects of cooling rates and type of freezing extenders on
309 cryosurvival of rat sperm. **Cryobiology**, v.67, p.109-16, Oct. 2013. Available from:
310 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23727068>>. Accessed: Nov. 20, 2015.
311 doi:10.1016/j.cryobiol.2013.05.009.

**CAPÍTULO 2 - CRYOPRESERVATION OF SPIX'S YELLOW-TOOTHED
CAVIES EPIDIDYMAL SPERM (*Galea spixii* WAGLER. 1831)**

**AM Silva¹, LB Campos¹, ECG Praxedes¹, LGT Bezerra¹, SSJ Moreira¹, MF
Oliveira², AR Silva^{*1}**

¹Laboratory of Animal Germplasm Conservation (LCGA), Universidade Federal Rural
do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró, RN, Brazil;

² Laboratory of Animal Morphophysiology, Universidade Federal Rural do Semi-Árido
(UFERSA), Mossoró, RN, Brazil

*Corresponding author: Laboratory of Animal Germplasm Conservation (LCGA),
Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró, RN, Brazil.

Tel.: +55 84 3317 8374

E-mail address: legio2000@yahoo.com (A.R. Silva).

Artigo nas normas da Revista Reproduction in Domestic Animals

**Cryopreservation of Spix's yellow-toothed caviens epididymal sperm (*Galea spixii*
Wagler. 1831)**

AM Silva¹, LB Campos¹, ECG Praxedes¹, LGT Bezerra¹, SSJ Moreira¹, AR Silva^{*1}

¹Laboratory of Animal Germplasm Conservation (LCGA), Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró, RN, Brazil;

*Corresponding author: Laboratory of Animal Germplasm Conservation (LCGA), Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró, RN, Brazil.

Tel.: +55 84 3317 8374

E-mail address: legio2000@yahoo.com (A.R. Silva).

Contents

The Spix's yellow-toothed cavy (*Galea spixii*) is a South American rodent whose captive breeding has been stimulated as a conservational and economic activity. However, information on its reproductive aspects remains scarce, thus hindering the development of assisted reproductive techniques as sperm cryopreservation. We used 12 pairs of testes–epididymis complexes of sexually mature animals. We immediately evaluated epididymal sperm obtained by retrograde flushing for concentration, motility through computer-assisted sperm analysis (CASA), membrane integrity, membrane functionality, morphology, well as in the chromatin integrity and in the binding capability of sperm. Samples were extended in a TRIS extender plus 20% egg yolk, containing glycerol, or dimethylsulfoxide – DMSO. Finally, samples were stored in 0.25 mL straws, frozen in liquid nitrogen, and thawed after one week, being reevaluated. The higher values for

postthawing for all parameters, were achieved by the usage of glycerol, when compared to DMSO ($P < 0.05$); however, no differences were found between glycerol and DMSO for chromatin integrity ($P > 0.05$). In conclusion, glycerol can be used as cryoprotectants for Spix's yellow-toothed cavy (*G. spixii*) epididymal sperm cryopreservation.

Introduction

The Spix's Yellow-toothed Cavy occurs eastern Bolivia to northeastern Brazil. It can be used as an experimental model for other threatened rodents such as the Candango Mouse and the Greater Wilfred's Mouse (*Wilfredomys oenax*) because this species of cavy has a stable population (IUCN 2015). The Spix's Yellow-toothed Cavy has potential for use in commercial production and some captive breeding farms in Brazil are producing it with economic repercussions, and this is an alternative for the preservation of the species, as well as a source of revenue (Oliveira et al. 2010).

The application of reproductive biotechnologies, are routinely used as conservation and reproductive management tools in wild animals and in animals bred for commercial purposes (Domingues et al. 2011; Ricarte et al. 2008). In this context, the collection of male gametes can be performed in several ways, and among them, electroejaculation is the method of choice for wild animals (Castelo & Silva. 2014), however there is no adaptation of this collection method for Spix's Yellow-toothed Cavy. Thus, the collection of epididymal sperm emerges as a viable alternative for this purpose (Martins et al. 2007).

The cryopreservation of epididymal sperm was reported in some wild rodents, including rat (Varisli et al. 2015), Chinchilla - *Chinchilla lanigera* (Gramajo-Bühler et al. 2012) Red-rumped Agouti - *Dasyprocta leporina* (Castelo et al. 2015), with success. It is

needed, however, during the processing of sperm for conservation, to establish an appropriate protocol for each species, which involves the adequacy of diluents used, in order to maintain sperm motility and viability standards (Hu et al. 2009). Adding rodent sperm to a TRIS-based media with 20% of egg yolk has showed good results in the cryopreservation of some species sperm, such as the chinchila (Gramajo-Bühler et al. 2012) Red-rumped Agouti (Castelo et al. 2015), and rat (Varisli et al. 2015).

Furthermore, the addition of substances that provide cell cryoprotection during temperature reduction is necessary to avoid the formation of intracellular ice crystals, and thus minimize possible damage to sperm plasma and acrosome membrane. These substances are called cryoprotective agents (CPAs) (Castro et al. 2011). They can be classified into extracellular and intracellular as their interaction with the sperm. Among the intracellular stand as glycerol and dimethylsulfoxide (DMSO), which are low molecular weight substances, permeable membrane, which act dehydrating and reducing the interior of the freezing point of the cells, hampering the formation of intracellular ice crystals (SZTEIN et al. 2001). Numerous studies have been conducted to evaluate the effectiveness and toxicity of other substances to sperm cells in various mammalian species (Silva & Guerra. 2011, Castelo et al. 2015). Glycerol, has been widely used in rodents such as agoutis (Silva et al. 2011) and chinchillas (Gramajo-Bühler et al., 2012), as well as DMSO has been used in murine (Cooper et al. 2008) and Red-rumped Agouti (Castelo et al. 2015). Though, its use in inadequate concentrations can have toxic effects on sperm cells (Alvarenga et al. 2000). Therefore, it is necessary to test different CPAs at various concentrations during the cryopreservation process and thereby establish more efficient in conserving sperm quality Spix's Yellow-toothed Cavy.

In order to determine the quality of the sperm and of the cryopreservation protocols efficiency, a wide array of qualitative analysis are performed and, among these,

the analysis of chromatin condensation and the evaluation of the binding capacity of sperm are nowadays highlighted. The analysis of chromatin condensation through toluidine blue dye has been used in Red-rumped Agouti (Castelo et al. 2015). This consists of a cationic dye, evaluates the ability of the dye molecules bind to DNA phosphate groups. When most of the phosphate groups are linked to protamines, thereby presenting a normal chromatin, as few of the dye molecules bind to DNA and the sperm have light blue color. However, when there DNA decondensation, there is increased binding of dye to DNA, allowing the resonance of electrons between molecules, resulting in a color ranging from dark blue to magenta. The evaluation of the binding capacity of sperm by the binding test using the yolk membrane of egg, has been successfully used to determine the binder capacity of fresh spermatozoa Vesper mice – *Calomys laucha* (Corcini et al. 2011), and cryopreserved of Red-rumped Agouti (Castelo et al. 2015). The membranes of egg's chicken are homologous the zona pellucida which includes the mammalian oocyte, which are present in the ZP1 and ZP3 glycoproteins (Mann 2008), thus being able to check the binding capacity of sperm of mammals.

The aim of this study was to evaluate the effect of different cryoprotectants on the morphofunctional parameters of frozen-thawed sperm derived from *Spix's* Yellow-toothed Cavy.

Material and Methods

The ethics committee of the UFERSA approved the experimental protocols as well as the animal care procedures used (Process n° 23091.002006/2013-78). All reagents were obtained from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Animal

The animals belonged to the Centre of Multiplication of Wild Animals from UFERSA, located in northeast Brazil (Mossoró. RN. Brazil; 5°100' S. 37°100' W). For the present study, twelve sexually mature male Spix's yellow-toothed caviés aging proximately 2 years old and weigh about 300 g were used. These animals were isolated from females for 15 days before the beginning, of the study and maintained in 12-h natural photoperiod. They were grouped and maintained in a covered paddock (3 x 3 m). The Spix's yellow-toothed cavy were fed a commercial rabbit ration and water *ad libitum*.

Collection of epididymal sperm

Individuals were pre medicated with intramuscular administration of 1 mg/kg xylazine hydrochloride (Rompun; Bayer, São Paulo, Brazil) and 15 mg/kg ketamine hydrochloride (Ketalar; Pfizer, São Paulo, Brazil). After 15 min, anesthesia was induced with 50 mg/kg sodium thiopental (Thiopentax; Cristalia, São Paulo, SP, Brazil) IV and the animals were euthanized with 1 mL/kg potassium chloride, IV (Vale et al. 2013). Immediately after slaughtering, the abdomen was opened and the testis (including the epididymis and proximal ductus deferens) were recovered. Then, the complexes were covered with gauze humidified with physiologic salt solution (NaCl 0.9%), stored in a beaker and immediately transported to the laboratory at room temperature (~ 27 °C). The cauda epididymis plus vas deferens were randomly submitted to sperm recovery by retrograde flushing methods, as described by Silva et al. (2011).

Sperm evaluation

The volume recovered from each epididymis was measured with a micropipette and the original flush volume (0.5 mL) was subtracted from it (Silva et al. 2011). The sperm concentration ($\times 10^6$ sperm/mL) for each sample was determined using a Neubauer counting chamber, and the number of recovered sperm was calculated. The sperm morphology was evaluated after examination of stained smears with Rose Bengal light microscopy at 1000 $\times$. Functional integrity of the sperm membrane was evaluated with a hypo-osmotic swelling (HOS) test, using the hypo-osmotic solution (0 mOsm/L) as reported by Silva et al. (2011). Two hundred sperm were examined, and those with a swollen, coiled tail were considered to have a functional membrane.

Computerized assessment of sperm motility parameters

The samples were evaluated by a sperm analyzer computer aided (CASA) (YVOS 7.4G (Hamilton-Thorn Motility Analyser 2047 (HTM). Hamilton Thorn Research. Inc. Beverly. MA. EUA). Samples of sperm (2 μ L) were placed into a Makler chamber maintained at 37.0°C and examined by phase contrast microscopy system with strobe illumination. The setup used was already pre-set for mice, with temperature 37 °C, *frame rate*, 60 frames/sec; *minino contrast*, 50; *straightness threshold*, 70%; *lower average speed trajectory (VAP) cutoff*, 5.0 μ /sec; *VAP average cutoff*, 0.0 μ /sec. Five non-consecutive fields were randomly selected and analyzed. The parameters analyzed were: number of cells counted, total motility (%), progressive motility (%), average speed path

(VAP $\mu\text{m} / \text{sec}$), linear velocity (VSL $\mu\text{m} / \text{sec}$), curvilinear velocity (VCL $\mu\text{m} / \text{sec}$) lateral amplitude of head (ALH μm), tail beat frequency (BCF Hz), progressivity (STR%) and linearity (LIN%). Still, all sperm were classified into four sub-populations: fast (VAP > MVV), medium (LVV < VAP < MVV), slow (VAP < LVV) and static.

Evaluation of sperm plasma membrane integrity

Plasma membrane integrity was assessed with a fluorescent solution containing fluorophores 6-carboxyfluorescein diacetate (0.46 mg CFDA/1 mL dimethylsulfoxide) and propidium iodide (0.5 mg PI/1 mL 0.9% saline solution). One aliquot of 10 μL thawed semen was added in 40 μL fluorescent solution. After 10 min, microscope slides of the stained samples were evaluated by epifluorescence microscopy (Episcopic Fluorescent attachment “EFA” Halogen Lamp Set. Leica. Kista. Sweden). A total of 200 sperm were counted for each sample stained with CFDA/PI and classified as having or not having an intact plasmalemma cell membranes stained in green (CFDA) were considered intact, whereas those stained in red (PI) or partially stained were considered non-intact (Castelo et al. 2015).

Chromatin integrity analysis

For chromatin analysis, we used fresh and frozen-thawed sperm aliquots (5 μL) for smears manufacturing. The smears were fixed in 3:1 ethanol:acetic acid for 1 min and then in 70% ethanol for 3 min; they were then immersed in HCl 4 M solution for 25 min. Finally, we washed them in distilled water and dried at room temperature. Smears were dropped with the toluidine blue dye (0.025% toluidine blue in McIlvaine buffer (sodium

citrate: phosphate pH = 4.0), covered with a coverslip and immediately evaluated in bright field microscope under 1000 x magnification. A total of 500 sperms were evaluated per smear in duplicate. The sperms lightly colored in light blue were classified as normal (negative) and those stained with violet to dark blue were considered as altered chromatin (positive) (Castelo et al. 2015).

Sperm binding test

The test was conducted for fresh and frozen-thawed sperm samples, as reported by Losano et al. (2015). The perivitelline membranes were obtained from fresh and non-fertile hen's eggs. The perivitelline membrane was prepared by separating the egg yolk from the albumen. The intact yolks were placed on parafilm and the membrane separated and washed with saline solution (NaCl, 0.9%). Then, the membrane was placed in a Petri dish and cut into squares (1 x 1 cm), each piece being placed in four-well plates containing the incubation medium. This medium was constituted of 114 mM NaCl; 3.1 mM KCl; 0.4 mM NaH₂PO₄; 10 mM calcium lactate; 25 mM NaHCO₃; 10 µg/mL phenol red; 1.4 mM caffeine; 2.0 mM CaCl₂.2H₂O; 0.5 mM MgCl₂; 10 mM Hepes; 6 mg/mL BSA; 0.45 mM sodium pyruvate; 5.5 mM glucose; 50 µg/mL gentamicin sulfate; pH 7.4-7.8.

After evaluation, sperm samples were washed in incubation medium (1:1), and centrifuged (700 Xg for 10 min) at room temperature. The supernatant was discarded and the pellet was diluted in incubation medium (200 µL), being the concentration adjusted to 1 x 10⁶ motile sperm/mL. The sperm cell suspension was added to the perivitelline membrane at a final volume of 500 µL, for 20 min at 38.5°C under a water bath. A minimum of 2-perivitelline membranes (two droplets) was used per replicate.

After co-incubation, the perivitelline membranes were washed for removal of loosely attached sperm, and stretched over a slide. The membranes were stained with Hoechst 33358 (10 µg/mL) and the sperm bound to it were counted, using an epifluorescence microscopy (Episcopic Fluorescent attachment “EFA” Halogen Lamp Set. Leica. Kista. Sweden) at 400×. For each sample, all sperm that were attached to the membrane in six different fields were counted, and the mean of adhered sperm was estimated (Barbato et al. 1998).

Extenders and freezing–thawing procedures

Samples containing sperm were divided into 6 aliquots immediately after collection and initial evaluation. After dilution in Tris plus 20% egg yolk, all samples were stored in a water jacket (30 mL) at 27 °C and equilibrated for 40 min at 15 °C into an isothermal box. Samples were then transferred to a biological oxygen demand incubator (Q315M26, Quimis, Diadema. Brazil) for 30 min to reach 4°C. After cooling. the extender plus 18%, 12%, 6% cryoprotectant (glycerol. DMSO), also at 5 °C, was slowly added into the samples, which resulted in a final concentration of 9%, 6% e 3% cryoprotectant respective in the extender. For all samples, the final dilution resulted in a sperm concentration of 100×10^6 sperm/mL. Sperm motility and vigor were evaluated immediately after the addition of cryoprotectant in the samples, which were then packed into 0.25-mL plastic straws and placed horizontally in a thermal insulated box for 5 min, 3 cm above liquid nitrogen (LN₂). The straws were then finally plunged into LN₂. After 1 week, samples were thawed by immersing the straws in a water bath at 37 °C for 1 min (Silva et al. 2011). Samples were immediately evaluated as reported for fresh spermatozoa.

Statistical analysis

Checking of data for normality was by the Shapiro–Wilk test, and for homoscedasticity by Levene’s test using the StatView 5.0 (SAS Institute, Inc, Cary, NY, USA). Values expressed in percentages were *arcsine* transformed before analysis. We checked the effects of cryoprotectants at different concentrations on the sperm parameters, including chromatin integrity and sperm-binding capability, by ANOVA followed by Fisher’s PSLD test, except for sperm vigor, its was by the nonparametric Mann-Whitney test. Differences were considered significant when $P \leq 0.05$.

Results

After epididymal retrograde flushing, the volume recovered was 2.4 ± 0.1 mL containing a concentration of $920.8 \pm 113.7 \times 10^6$ sperm/mL. The characteristics of fresh and frozen-thawed sperm are shown in Table 1. In detriment of DMSO, glycerol in any concentration provided adequate conservation of functional and structural plasma membrane integrity ($P < 0.05$), as evaluated by hyposmotic test and fluorescence microscopy, respectively. Relating to chromatin integrity, it was preserved after thawing in the use of glycerol and DMSO in all treatments ($P < 0.05$).

Regarding CASA parameters (Table 2), glycerol also provided a better conservation than DMSO in any concentration ($P < 0.05$); however, both act on a similar way on the conservation of STR and LIN. Among all glycerol concentrations, the 6% glycerol provided the best preservation of total motility and rapid sperm subpopulation ($P < 0.05$).

270 When assessing the egg's perivitelline membrane binding test, it was found that
271 the samples frozen with 6% or 9% of glycerol obtained similar results to the fresh sample
272 and were higher than the samples cryopreserved with DMSO, as showed on Table 3 ($P <$
273 0,05).

1 Table 1. Mean values ($\pm$ S.D.) for fresh and frozen/thawed epididymal sperm characteristics collected from Spix's yellow-toothed caviés (*Galea*
2 *spixii* Wagler, 1831) (n = 12).

Parameters	Epididymal sperm						
	Fresh	Glicerol (3%)	Glicerol (6%)	Glicerol (9%)	DMSO (3%)	DMSO (6%)	DMSO (9%)
Osmotic response (%)	66.4 $\pm$ 3.3 ^a	40.66 $\pm$ 6.3 ^b	42.5 $\pm$ 7.1 ^b	39.5 $\pm$ 5.0 ^b	14.8 $\pm$ 6.7 ^c	9.1 $\pm$ 1.1 ^c	12.4 $\pm$ 5.9 ^c
Normal sperm morphology (%)	84.7 $\pm$ 1.9 ^a	71.81 $\pm$ 4.2 ^{ab}	82.8 $\pm$ 2.1 ^{ab}	75.7 $\pm$ 3.7 ^{ab}	69.0 $\pm$ 2.2 ^{bc}	75.2 $\pm$ 2.9 ^{ab}	64.3 $\pm$ 1.2 ^c
Membrane integrity (%)	78.5 $\pm$ 7.6 ^a	55.17 $\pm$ 5.5 ^b	68.4 $\pm$ 4.1 ^b	59.1 $\pm$ 4.9 ^b	6.5 $\pm$ 1.5 ^c	5.3 $\pm$ 1.2 ^c	3.8 $\pm$ 1.1 ^c
Chromatin integrity (%)	97.8 $\pm$ 0.3 ^{ab}	96.25 $\pm$ 0.4 ^b	95.6 $\pm$ 0.1 ^b	96.6 $\pm$ 0.3 ^b	94.0 $\pm$ 0.4 ^b	95.5 $\pm$ 0.4 ^b	95.4 $\pm$ 0.4 ^b

^{ab} Lowercase letters superscripts indicate significant difference between experimental groups. (P < 0.05);

6 Table 2. Kinetic motility patterns (mean $\pm$ S.D.) observed in Spix's yellow-toothed caviar (*Galea spixii* Wagler, 1831) fresh and frozen/thawed
7 epididymal sperm (n = 11) by computerized assisted semen analysis – CASA.

Sperm motility patterns	Epididymal sperm						
	Fresh	Glycerol (3%)	Glycerol (6%)	Glycerol (9%)	DMSO (3%)	DMSO (6%)	DMSO (9%)
Total motility (%)	81.8 $\pm$ 1.7 ^a	50.0 $\pm$ 3.8 ^c	60.9 $\pm$ 4.4 ^b	52.3 $\pm$ 2.6 ^{bc}	3.1 $\pm$ 1.2 ^d	4.0 $\pm$ 1.2 ^d	3.7 $\pm$ 3.7 ^d
Progressive motility (%)	14.3 $\pm$ 1.6 ^a	4.6 $\pm$ 0.38 ^b	5.8 $\pm$ 0.7 ^b	5.1 $\pm$ 0.4 ^b	0.1 $\pm$ 0.1 ^c	0.1 $\pm$ 0.1 ^c	0.1 $\pm$ 0.1 ^c
Velocity average pathway (μ m/s)	83.2 $\pm$ 7.7 ^a	56.4 $\pm$ 2.5 ^b	66.2 $\pm$ 4.8 ^b	58.5 $\pm$ 2.9 ^b	40.2 $\pm$ 4.8 ^c	36.9 $\pm$ 7.2 ^c	28.4 $\pm$ 5.4 ^c
Velocity straight line (μ m/s)	41.9 $\pm$ 4.9 ^a	28.6 $\pm$ 1.2 ^b	32.5 $\pm$ 2.4 ^b	29.5 $\pm$ 1.7 ^b	18.8 $\pm$ 1.9 ^c	19.4 $\pm$ 4.9 ^c	14.5 $\pm$ 14.5 ^c
Velocity curvilinear (μ m/s)	160.8 $\pm$ 11.4 ^a	116.5 $\pm$ 5.5 ^b	131.5 $\pm$ 8.2 ^b	119.4 $\pm$ 4.9 ^b	85.4 $\pm$ 9.2 ^c	85.8 $\pm$ 12.9 ^c	62.6 $\pm$ 10.7 ^c
Amplitude lateral head (μ m)	7.9 $\pm$ 0.3 ^a	8.1 $\pm$ 0.4 ^a	8.5 $\pm$ 0.2 ^a	8.9 $\pm$ 0.3 ^a	4.7 $\pm$ 1.6 ^b	4.0 $\pm$ 1.3 ^b	3.7 $\pm$ 1.4 ^b
Beat cross frequency (Hz)	35.7 $\pm$ 1.9 ^a	34.2 $\pm$ 0.6 ^a	32.9 $\pm$ 0.8 ^a	35.7 $\pm$ 0.7 ^a	34.2 $\pm$ 3.3 ^a	34.7 $\pm$ 4.2 ^a	26.6 $\pm$ 4.0 ^b
Straightness (%)*	42.0 $\pm$ 1.8	49.3 $\pm$ 1.3	48.8 $\pm$ 1.6	50.3 $\pm$ 1.6	50.8 $\pm$ 4.5	44.5 $\pm$ 5.8	47.7 $\pm$ 6.8
Linearity (%)*	23.8 $\pm$ 1.2	24.9 $\pm$ 0.9	25.0 $\pm$ 0.9	25.1 $\pm$ 0.9	24.8 $\pm$ 2.3	21.8 $\pm$ 3.4	23.8 $\pm$ 3.7
Sperm subpopulations							
Rapid (%)	55.3 $\pm$ 5.2 ^a	19.0 $\pm$ 1.7 ^c	27.7 $\pm$ 3.1 ^b	19.4 $\pm$ 1.4 ^c	0.7 $\pm$ 0.3 ^d	0.9 $\pm$ 0.5 ^d	0.3 $\pm$ 0.2 ^d
Medium (%)	26.3 $\pm$ 3.6 ^a	31.0 $\pm$ 2.8 ^a	33.3 $\pm$ 2.8 ^a	32.8 $\pm$ 2.3 ^a	2.3 $\pm$ 0.9 ^b	3.1 $\pm$ 0.9 ^b	3.3 $\pm$ 1.3 ^b
Slow (%)	0.0 $\pm$ 0.0 ^a	0.6 $\pm$ 0.2 ^b	0.2 $\pm$ 0.1 ^a	0.3 $\pm$ 0.1 ^{ab}	0.3 $\pm$ 0.1 ^{ab}	0.2 $\pm$ 0.1 ^a	0.4 $\pm$ 0.2 ^b
Static (%)	18.3 $\pm$ 1.7 ^a	49.5 $\pm$ 3.8 ^b	38.8 $\pm$ 4.4 ^c	47.3 $\pm$ 2.7 ^{bc}	96.8 $\pm$ 1.3 ^d	95.9 $\pm$ 1.3 ^d	96.1 $\pm$ 1.5 ^d

^{ab} Lowercase letters superscripts indicate significant difference between experimental groups. (P < 0.05);

9 Table 3. Mean ($\pm$ S.D.) and range values for Spix's yellow-toothed cavies (*Galea spixii* Wagler, 1831) fresh and frozen-thawed sperm
 10 bound to the hen's yolk perivitelline membrane (n = 11).

Sperm	Fresh	Glicerol (3%)	Glicerol (6%)	Glicerol (9%)	DMSO (3%)	DMSO (6%)	DMSO (6%)
Mean $\pm$ S.D.	289.2 $\pm$ 15.2 ^a	196.4 $\pm$ 22.9 ^b	227.0 $\pm$ 20.2 ^{ab}	226.8 $\pm$ 26.5 ^{ab}	85.1 $\pm$ 12.5 ^c	75.6 $\pm$ 12.6 ^c	80.8 $\pm$ 13.2 ^c
Binding range	236.0 – 384.9	71.4 – 333.2	52.3 – 269.8	41.0 – 350.7	29.6 – 159.2	29.6 – 149.8	29.6 – 194.2

11 ^{ab} Lowercase letters superscripts indicate significant difference between experimental groups in the same time. (P < 0.05);

Discussion

Along the years, various studies have been showing that cryoprotectants can act on a different manner according to the various rodent species. While DMSO was shown as being more efficient than glycerol for the mice sperm cryopreservation (Cooper et al. 2008), this last one remains touted as the universal cryoprotectant for male gametes (Silva et al. 2011; Castelo et al. 2015), including the **Spix's yellow-toothed caviés**, as demonstrated in the present study. On a similar way, when studying the action of different cryoprotectants on chinchilas sperm quality (*Chinchilla lanigera*), Gramajo-Bühler et al. (2012) found that there are negative effects on physiological parameters on different degrees, which have a direct impact on sperm quality, concluding that glycerol was effective in cryopreserving the sperm of this species. A similar study was conducted in epididymal sperm of agoutis, where samples cryopreserved with glycerol (6%) presented better post-thawing quality than those containing DMSO (6%) (Castelo et al. 2015). The beneficial effect of glycerol may be due to the osmotic effect, as due to its direct effect on the plasma membrane. In the membrane, there is evidence that it binds to phospholipids present in the sperm head, reducing its fluidity, and interacting with protein-linked glycoproteins, increasing its stability (Parks and Graham 1992)

Therefore, the glycerol provided a more efficient conservation for the most of sperm parameters when compared to DMSO. This fact may be related to the penetration rate of the cryoprotectants. In murine it was found that DMSO had a faster rate of inflow of sperm cells than glycerol (Cooper et al. 2008). The high penetration cryoprotectants can cause the cell to swell and induce volume adjustment which is driven by the loss of osmolytes (Cooper et al. 2008). This osmolyte loss compromises post-thawing sperm volume regulation, an important event, because when the cell volume adjustment is

inadequate, it can lead to infertility (Cooper et al. 2004). It is known that CPAs act decreasing the dehydration rate during freezing and allow the dehydration to continue to happen when temperatures are below zero. This allows a greater period of time for the cells to osmotically respond, what decreases the probability of intracellular ice formation, (Akhoondi et al. 2012; Oldenhof et al. 2013), and the fast influx of DMSO may have prevented that mechanism to properly occur.

In addition, the DMSO affects the permeability of the membrane, because where its molecules readily partition into the bilayer occupying a position just beneath the lipid headgroups, reduce bilayer thickness, increase headgroup area, markedly reduce both the area compressibility modulus and the bending rigidity of the membrane, water and induce pore formation. However, larger permeability of the membrane can allow the rapid ingress of water of Resulting in cell lysis (Notman et al. 2006). Thus, an excess amount of the cryoprotectant penetrating the cell can lead to sperm toxicity (Varela Jr et al. 2015).

The action of a cryoprotectant can vary according to the composition of the sperm plasma membrane from different species. The lipid composition of the plasma membrane varies among species mammals; however, it generally present about 70% of phospholipids, 25% fat 5% neutral and glycolipids, being distributed asymmetrically between the two bilayer leaflets. (Harrison and Gadella. 2005). The relationship between cholesterol and phospholipid determines the substances flow through the membrane. Species that have higher cholesterol concentration have lower membrane damage during the cooling process. (Darin-Bennett et al.1977). For instance, the relationship between cholesterol and phospholipids in ovine, in which glycerol was successfully used for sperm cryopreservation, is 0.85 (Holt and North 1985). In rabbits, in which the DMSO was effective to cryopreserve the sperm (Rosato and Iaffaldano 2013), the lipid bilayer of the sperm membrane is mainly composed of phospholipids (69% of the total amount of

lipids), with phosphatidylcholine being the major one, followed by phosphatidylethanolamine and lyso-phosphatidylcholine. Sterols are the second major component of rabbit spermatozoa and are considered to be important modulators of membrane fluidity and the acrosome reaction (Mourvaki et al. 2010).

According to Muiño et al. (2008) after the process of freezing and thawing, motility and progressive parameters evaluated on CASA correlate positively with the resistance of the cold shock to the sperm and fertility. Awad et al. (2011) stated, that values found on CASA (VAP, VSL, VCL and LIN) would be affected by the type and concentration of the cryoprotectant. However, in the present study, we observed that there was difference between the actions of cryoprotectants, regardless of their concentrations, where glycerol proved to be more effective than DMSO for cavies' sperm freezing. Moreover, glycerol (6%) showed the best motility and rapid subpopulation parameters, and studies have shown that high progressive speed subpopulations may be related to a better sperm quality and fertility (Muiño et al. 2008; Ferraz et al. 2014).

However among the tested treatments, glycerol was superior to DMSO, and these results corroborate to the findings for agouti when epididymal sperm was cryopreserved with glycerol (3%), with $47.5 \pm 8.4\%$ of motility and, and a vigor of 3.3 ± 0.8 (Castelo et al. 2015). Its use is also reported for successfully cryopreserving chinchilla sperm (post-thawing motility: $\sim 70\%$) (Gramajo-Bühler et al. 2012); and mice ($61.4 \pm 2.6\%$) (Tada et al. 1990).

Regarding the membrane integrity and functionality analysis, there was a reduction in the quality on the frozen-thawed samples, which was expected. The cell membranes consist of a mixture of different kinds of lipids, each with unique properties, containing sterols and proteins. In this sense, the cooling and cryopreservation can alter the structure and / or biomolecules conformation (lipids, proteins, nucleic acids), which

may be irreversible and impair its function (Gousset et al. 2002; Caffrey and Hogan 1992). Although cryopreservation exposes cells to severe osmotic stress, wherein the cells have limits of osmotic tolerance when above or below these thresholds, cell death may occur, but when the membrane modifies its fluidity depending on temperature, its higher rigidity could explain its increased resistance to osmotic stress (Siem et al. 2015). In this context glycerol was better in the conservation during the cryopreservation process, corroborating studies in agouti (Castelo et al. 2015), chinchilla (Gramajo-Bühler et al. 2012), and mouse (Tada et al. 1990), in which it also preserved the membrane functionality and integrity.

It has been reported that morphological alterations to the cell structure and to its DNA may occur during the temperature variations in the freezing and in the thawing process (Tasdemir et al. 2013). In cavies, we observed that treatment with 9% DMSO promoted higher incidence of abnormal sperm, but increase in chromatin decondensation was observed in all treatments. The effects of cryopreservation on the integrity of the sperm nucleus are not well characterized (Yildiz et al. 2007). It is reported that the cryopreservation process of freezing and thawing can increase inappropriate chromatin condensation in human (Hammadeh et al. 2001), (Linfor and Meyers 2002), boar (Fraser and Strzezek 2004), horse ram (Peris et al. 2004) and mouse sperm (Yildiz et al. 2007). Thus, both DMSO and glycerol were effective in the preservation of condensation of sperm chromatin in cavies.

Considering the homology of egg perivitelline membrane glycoproteins to some mammalian ZPs, especially ZP1 and ZP3, sperm-egg-binding assays figure as an inexpensive and practical method to complement conventional and functional semen analysis (Mann 2008). This test has been associated with fertilization and cleavage rates in pigs (Reis et al. 2003), also verified a relationship between fertility and the number of

rooster spermatozoa bound to egg perivitelline membrane (Barbato et al. 1998). In the present study demonstrated that treatment with lower efficiency in the conservation of sperm quality, DMSO, also presented the least amount of sperm bound to egg perivitelline membrane. Corroborating the statement of Losano et al. (2014) that the number of spermatozoa bound to the egg perivitelline membrane is highly correlated by the ratio of thawed/dead spermatozoa. According to Castelo et al. (2015) DMSO could probably change sperm membrane structure, thus leading to the loss of oocyte-binding sites, still Moreover, intra- and extracellular changes prevent the arising of new sites, such as proteolysis, and modification of glycoconjugates on the cell surface, which directly affects the sperm-binding capacity.

Overall, we can see that most of the evaluated parameters suffered a decrease in its quality when DMSO was used as cryoprotectant for Spix's yellow-toothed cavies' sperm; on the other hand, glycerol in any concentration was evidenced to be effective for the same proposal. In conclusion, glycerol (3, 6 or 9%) can be used as cryoprotectants for Spix's yellow-toothed cavies (*G. spixii*) epididymal sperm cryopreservation. We found important information about genetic material conservation of cavies that will be useful in future researches, in the establishment of germplasm banks as well as for the reproductive management of this species in captivity.

References

- Akhoondi M, Oldenhof H, Sieme Wolkers; WF, 2012: Freezing-induced removal of water from phospholipid head groups in biomembranes. *Biomed Spectrosc Imagin* **1**, 293-302.
- Alvarenga MA, Landim-Alvarenga FC. Moreira RM, Cesarino MM, 2000: Acrosomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packaging systems. *Equine Vet J* **32**, 541-545.

- Varela Jr AS, Silva EF, Cardoso TF, Namba EY, Jardim RD, Streit Jr DP, Corcini CD, 2015: The role of dimethyl sulfoxide in the cryopreservation of Curimba (*Prochilodus lineatus*) semen. *Semina Ciências Agrárias* **36**, 3471-3480.
- Awad MM, 2011: Effect of some permeating cryoprotectants on CASA motility results in cryopreserved bull spermatozoa. *Anim Reprod Sci* **123**, 157-162.
- Barbato GF, Cramer PG, Hammerstedt RH, 1998: A practical in vitro sperm-egg binding assay that detects subfertile males. *Biol Reprod* **58**, 686-699.
- Caffrey M, Hogan J, 1992: LIPIDAT: A database of lipid phase transition temperatures and enthalpy changes. DMPC data subset analysis. *Chem Phys Lipids* **61**, 1-109.
- Castelo TS, Silva AM, Bezerra LG, Costa CY, Lago AE, Bezerra JA, Campos LB, Praxedes EC, Silva AR, 2015: Comparison among different cryoprotectants for cryopreservation of epididymal sperm from agouti (*Dasyprocta leporina*). *Cryobiology* **71**, 442-7.
- Castelo T, Silva AR, 2014: Eletroejaculação em mamíferos silvestres: principais fatores que afetam sua eficiência. *Rev Bras Reprod Ani* **38**, 208-213.
- Castro SV, Carvalho AA, Silva CMG, Faustino LR, Figueiredo JR, Rodrigues APR, 2011: Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. *Acta Scientiae Veterinariae* **39**, 1-18.
- Cooper TG, Yeung CH, Wagenfeld A, Nieschlag E, Poutanen M, Huhtaniemi I, Sipila P, 2004: Mouse models of infertility due to swollen spermatozoa. *Mol Cell Endocrinol* **216**, 55-63.
- Cooper TG, Barfield JP, Yeung CH, 2008: The tonicity of murine epididymal spermatozoa and their permeability towards common cryoprotectants and epididymal osmolytes. *Reproduction* **135**, 625-633.

- Corcini CD, Stephan MHL, Colares EP, Santos ECS, Varela JrAS, Bongalhardo DC. Lucia JrT, 2011: In vitro assays for vesper mice (*Calomys laucha*) sperm using heterologous substrates from nonrodent species. J. Exp. Zool. **317**, 96-102.
- Darin-Bennett A, White IG, 1977: Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. Cryobiology **14**, 466-470.
- Domingues SFS, Lima JS, Oliveira KG, Santos RR, 2011: Biotecnologias de reprodução como uma estratégia complementar à conservação in situ de primatas neotropicais ameaçados de extinção: perspectivas e desafios. Rev Bras Reprod Anim. **35**, 124-129.
- Ferraz MAMM, Morató R, Yeste M, Arcarons N, Peña AI, Tamargo C, Hidalgo CO, Muinõ R, Mogas T, 2014: Evaluation of sperm subpopulation structure in relation to in vitro sperm-oocyte interaction of frozen-thawed semen from Holstein bulls. Theriogenology **81**, 1067-1072.
- Fraser L, Strzezek J, 2004: The use of comet assay to assess DNA integrity of boar spermatozoa following liquid preservation at 5 and 16 8C. Folia Histochem Cyto **42**, 49-55.
- Gousset K, Wolkers WF, Tsvetkova NM, Oliver AE, Field CL, Walker NJ, Crowe JH, Tablin F, 2002: Evidence for a physiological role for membrane rafts in human platelets. J Cell Physiol **190**, 117-128.
- Gramajo-Bühler MC, Pucci-Alcaide F, Sánchez-Toranzo G, 2012: Effect on sperm quality of different cryoprotectants in sperm of *Chinchilla lanígera*. Zygote **21**, 351-357.
- Hammadeh ME, Greiner S, Rosenbaum P, Schmidt W, 2001: Comparison between human sperm preservation medium and TEST-yolk buffer on protecting

- chromatin and morphology integrity of human spermatozoa in fertile and subfertile men after freezethawing procedure. *J Androl* **22**, 1012-1018.
- Harrison RA, Gadella BM, 2005: Bicarbonate-induced membrane processing in sperm capacitation. *Theriogenology* **63**, 342-351.
- Holt, WV, North RD, 1985: Determination of liquid components and thermal phase transition temperature in an enriched plasma membrane fraction from spermatozoa. *J Reprod Fertil* **73**, 285-294.
- Hu JH, Li QW, Chen YL, Jiang, ZL, Jia YH, Wang LQ, Ou BB, 2009: Effects of addition of vitamin B12 to the extender on post-thaw motility, acrosome morphology, and plasma membrane integrity in bull sêmen, *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, v. 33, p. 379-384, 2009.
- IUCN (*International Union for Conservation of Nature*). Red List of Threatened Species. Version 2014.3. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 03 May 2015.
- Sztejn JM, Noble K, Farley JS, Mobraaten LE, 2001: Comparison of permeating and nonpermeating cryoprotectants for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology* **41**, 28-39.
- Linfor JJ, Mayers SA, 2002: Detection of DNA damage in response to cooling injury in equine spermatozoa using single-cell gel electrophoresis. *J Androl* **23**, 107-113.
- Losano JDA, Angrimani DSR, Pereira RJG, Rocha AM, Criscuolo TS, Barnabe VH, Mendes CM, Assumpção MEOA, Nichi M, 2014: Utilisation of sperm-binding assay combined with computer-assisted sperm analysis to evaluate frozen-thawed bull sêmen. *Andrologia* **47**, 77-84.
- Mann K, 2008: Proteomic analysis of the chicken egg vitelline membrane. *Proteomics* **8**, 2322-2332.

- Martins CF, Rumpf R, Pereira DC, Dode MN, 2007: Cryopreservation of epididymal bovine spermatozoa from dead animals and its uses *in vitro* embryo production. Anim Reprod Sci **101**, 326-331.
- Mourvaki E, Cardinali R, Roberti R, Bosco AD, Castellini C, 2010: Desmosterol, the main sterol in rabbit semen: distribution among semen subfractions and its role in the *in vitro* spermatozoa acrosome reaction and motility. Asian J Androl **12**, 862-870
- Muiño R, Tamargo C, Hidalgo CO, Peña AI, 2008: Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Holstein bulls: Effects of cryopreservation and between-bull variation. Anim Reprod Sci **109**, 27-39.
- Notman R, Noro M, O'malley B, Anwar J, 2006: Molecular basis for dimethylsulfoxide (DMSO) action on lipid membranes. J Am Chem Soc **128**, 13982-13983
- Oldenhof H, Heutelbeck A, Bléasse AK, Bollwein H, Wolkers WF, Sieme H, 2015: Tolerance of spermatozoa to hypotonic stress: role of membrane fluidity and correlation with cryosurvival. Reprod Fertil Dev **27**, 285-293.
- Oliveira GB, Rodrigues MN, Sousa ES, Albuquerque JFG, Moura CEB, Ambrósio CE, Miglino MA, Oliveira MF, 2010: Origem e distribuição dos nervos isquiáticos do preá. Ciência Rural **40**, 1741-1745.
- Parks JE, Graham JK, 1992: Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. Theriogenology **38**, 209-222.
- Reis GR, Bernardi ML, Wentz I, Bortolozzo FP, Weitze KF, Amann R, Kellers C, Zemmrich J, 2003: Fertilidade de sêmen suíno avaliada pelo teste de ligação dos espermatozoides a um substrato sintético. Pesq agropec bras **38**, 1343-1349.

- Ricarte ARF, Araújo SAC, Dantas TVM, Costa EC, Silva JBA, Silva MF, 2008: Possibilidades de aplicação de biotecnologias reprodutivas em animais de produção acometidos por agentes víricos. *Rev Bras Reprod Anim* **32**, 3-8.
- Rosato MP, Iaffaldano N, 2013: Cryopreservation of rabbit semen: Comparing the effects of diferente cryoprotectants, cryoprotectant-free vitrification, and the use of albumin plus osmoprotectants on sperm survival and fertility after standard vapor freezing and vitrification. *Theriogenology* **79**, 508-516.
- Sieme H, Oldenhof H, Wolkers WF, 2015: Sperm Membrane Behaviour during Cooling and Cryopreservation. *Reprod Dom Anim* **50**, 20-26.
- Silva MA, Peixoto GCX, Santos EAA, Castelo TS, Oliveira MF, Silva AR, 2011: Recovery and cryopreservation of epididymal sperm from agouti (*Dasiprocta aguti*) using powdered coconut water (ACP-109c) and Tris extenders. *Theriogenology* **76**, 1084-1089.
- Silva SV, Guerra, MMP, 2011: Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. *Rev Bras Reprod Anim* **35**, 370-384.
- Tada N, Sato M, Yamanoi J, Mizorogi T, Kasai K, Ogawa S, 1990: Cryopreservation of mouse spermatozoa in the presence of raffinose and glycerol. *J Reprod Fert* **89**, 511-516.
- Tasdemir U. Buyukleblebici S, Tuncer PB, Coskun E, Ozgurtas T, Aydın FN, Buyukleblebici O, Gurcan IS, 2013. Effects of various cryoprotectants on bull sperm quality, DNA integrity and oxidative stress parameters. *Cryobiology* **66**, 38-42.

- VALE, AM, Oliveira GB, Favaron PO, Miglino MA, Paula VV, Silva AR, Oliveira MF, 2013. Dinâmica da inversão do saco vitelino em preás (*Galea spixii* Wagler, 1831). *Pesq Vet Bras* **33**, 1033-1040.
- VARISLI O, AGCA C, AGCA Y, 2015: Influence of extenders and cooling rates on epididymal sperm of Lewis rat strain. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* **62**, 57-62.
- Yildiz C, Ottaviani P, Law N, Ayearst R, Liu L, McKerlie C, 2007: Effects of cryopreservation on sperm quality, nuclear DNA integrity, in vitro fertilization, and in vitro embryo development in the mouse. *Reproduction* **133**, 585–595.

CONCLUSÃO GERAL

O tris é um diluente indicado para a recuperação de espermatozoides epididimários de *G. Spixii*. O glicerol (3, 6 ou 9%) pode ser usado como crioprotetores na criopreservação de espermatozoides epididimários de preás (*Galea spixii*).

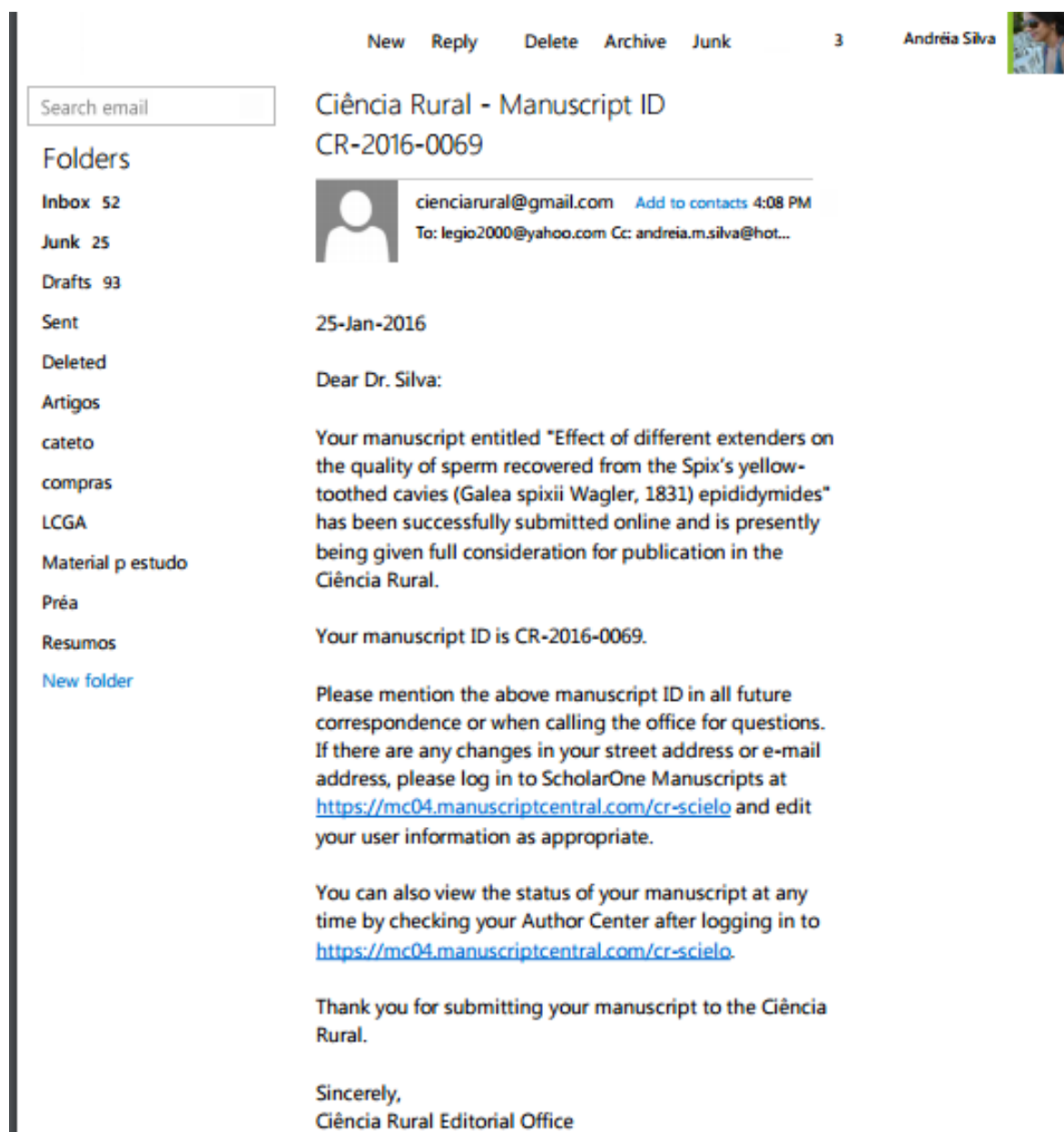
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Haja vista a importância ecológica e econômica do preá, assim como a escassez de informações na literatura sobre tal espécie, há a necessidade de pesquisas no intuito de obter maior conhecimento sobre a sua fisiologia. Assim, o presente estudo possibilitou a obtenção de informações úteis para a aplicação da criopreservação nesta espécie, identificando diluente e crioprotetor intracelular eficientes no processamento e sobrevivência dos espermatozoides à colheita e armazenamento em nitrogênio líquido. Permitindo o armazenamento do material genético dessa espécie, seja para formação de bancos de germoplasma animal ou para a utilização futura em técnicas reprodutivas.

Como perspectivas, os próximos passos deverão ser direcionados a coleta de sêmen por eletroejaculação, inseminação artificial, assim como o aperfeiçoamento do protocolo de criopreservação, na tentativa de descongelar amostras com maior qualidade. E, assim, otimizar o manejo reprodutivo dessa espécie em cativeiro, seja para fins científicos ou comerciais.

ANEXOS

ANEXO A – CARTA DE SUBMISSÃO DO ARTIGO: “EFEITO DE DIFERENTES DILUENTES NA QUALIDADE DE ESPERMATOZOIDES RECUPERADOS DOS EPIDÍDIMOS DE PREÁS (*Galea Spixii*)” À REVISTA ANIMAL CIÊNCIA ANIMAL



ANEXO B - Preparo da solução utilizadas no Teste de Ligação a Membrana Perivitelina do Ovo de Galinha

1. Soluções de estoque de íons

a. Sulfato de gentamicina - 10 mg/mL:

50 mg / 5 mL

b. NaH_2PO_4 - 0,2 M:

0,239 g / 10 mL

c. MgCl_2 - 0,4 M:

0,3748 g / 10 mL

d. Piruvato de sódio - 20 mM:

0,022 g / 10 mL

OBS. Utilizar água SIGMA em todas as soluções.

2. Meio de Fertilização

a. Solução de Estoque - pH: 7,3-7,4:

50 mL de Água SIGMA

0,3331 g de NaCl

0,0115 g de KCl

100 μL de NaH_2PO_4

93 μL de Lactato de sódio

0,105 g de NaHCO_3

100 μL de Vermelho de fenol

0,0135 g de Cafeína

0,0147 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

64 μL de MgCl_2

0,1191 g de Hepes

b. Solução de Trabalho – pH: 7,4-7,8

10 mL de Água SIGMA

0,060 g de BSA

227 μL de Piruvato de Sódio

0,009 g de Glicose

100 μL de Sulfato de gentamicina

ANEXO C - Preparo das Soluções das Sondas Fluorescentes

1.CMXRos (Mito Tracker Red®)

a. Solução de estoque:

500 μ M ou 50 μ g Mito Tracker Red®

94 μ L DMSO

Obs: Armazenar em freezer, no escuro.

b. Solução de trabalho:

0,1 μ L da solução de estoque

1mL Tris (diluyente utilizado)

2.Solução de 6-carboxifluoresceína diacetato (C-FDA)

a.Solução de estoque:

2,3 mg de C-FDA

5 ml de DMSO (Dimetil sulfóxido)

b.Solução de trabalho:

C-FDA 20 μ L

3.Solução de Iodeto de propídio (IP)

a.Solução de estoque:

2 mg de IP

4 ml de 0,9% NaCl

b.Solução de trabalho:

IP 10 μ L

4.Solução de HOECHST 33358 – 10 μ g/mL

a. Solução de Estoque:

5 mg / 5 mL de Água

b. Solução de Trabalho:

10 μ L de HOECHST 33258

1,5 mL de meio de fertilização

V Workshop on Male Reproductive Biology, 2015.

Testing the binding-capability of *Galea spixii* epididymal sperm frozen in different cryoprotectants

Alexandre R Silva^{1*}, Andréia M Silva¹, Érica C G Praxedes¹, Livia B Campos¹, Gabriela L Lima¹, Laressa M Almeida¹

¹Laboratory of Animal Germplasm Conservation, UFERSA, Mossoró, RN, Brazil

The Spix's yellow-toothed cavy (*Galea spixii*) is a South American rodent whose captive breeding has been stimulated as a conservational and economic activity. However, information on its reproductive aspects remains scarce, thus hindering the development of assisted reproductive techniques as sperm cryopreservation. For the development of cryopreservative protocols, it is necessary to challenge the sperm at using functional tests, as the hen's yolk perivitelline membrane binding test that mimics the capability of sperm for interacting to the oocyte ZP3 protein. Therefore, the aim of this study was to compare different cryoprotectants used for cryopreservation of *G. spixii* epididymal sperm through a functional binding test. For this purpose, twelve testicle-epididymis complexes derived from adult individuals were subjected to the retrograde flushing method for sperm retrieval using a Tris solution (1.5 ml per epididymis). The samples were evaluated for sperm concentration, and total motility (%) through computer-aided sperm analyzer (IVOS 7.4G, Hamilton-Thorne Research TM, Beverly, MA, USA). Thereafter, samples were diluted in a Tris extender plus 20% egg yolk and 3% glycerol or 3% dimethyl sulfoxide (DMSO), packed in 0.25 mL plastic straws, frozen and stored in liquid nitrogen. After one week, samples were thawed at 37 °C and reevaluated for total motility. Aliquots (1×10^6 sperm) from both fresh and frozen-thawed samples were subjected to the hen's yolk perivitelline membrane binding test, which was conducted under water bath 20 min at 38.5 °C, and evaluated after staining with Hoechst 33358 (10 µg/mL) using an epifluorescence microscopy (Episcopic Fluorescent attachment "EFA" Halogen Lamp Set. Leica, Kista, Sweden) for counting the number of bound-sperm. Data were expressed as mean $\pm$ SEM and examined by ANOVA followed by the Student t test ($P < 0.05$). The recovery method provided $980.8 \pm 113.7 \times 10^6$ on average. Fresh samples presented a total sperm motility of $81.75 \pm 1.70\%$ and 289.18 ± 15.19 sperm bound to the perivitelline membrane. After thawing, we verify that samples frozen using glycerol presented a sperm motility of $50.00 \pm 3.80\%$ and 196.40 ± 22.86 sperm bound to the perivitelline membrane, while DMSO provided lower values of $3.08 \pm 1.19\%$ motile sperm and 85.11 ± 12.46 bound sperm ($P < 0.05$). Similar results conducted in rodents as the mice and agoutis demonstrate the superiority of glycerol when compared to DMSO for sperm cryopreservation. In fact, DMSO is pointed for hindering the sperm binding capability due to cause damage or disaggregation of the membrane receptors. In conclusion, the use of an extender constituted of Tris plus 20% egg yolk and 3% glycerol provides an effective preservation of the binding-capability of *G. spixii* epididymal sperm.

Financial Support: CNPq

Keywords; Spix's yellow-toothed cavy, sperm binding test, cryopreservation, reproduction.

XXI Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 2015.

Criopreservação de espermatozoides epididimários de preá (*Galea spixii* Wagler, 1831)*Cryopreservation of epididymal sperm of Spix's yellow-toothed caviar (*Galea spixii* Wagler, 1831)***Andréia Maria da Silva¹, Carlos Alexandre de Carvalho Apolinário¹, Gislayne Chistianne Xavier Peixoto¹, Ana Liza Paz Souza¹, Thibério Souza Castelo¹, Arthur Emmanuel Araujo Lago¹, Alexandre Rodrigues Silva¹**¹Laboratório de Conservação e Germoplasma Animal – UFERSA, Mossoró, RN, Brasil
Email: andreia.m.silva@hotmail.com

O preá silvestre do semiárido (*Galea spixii* Wagler, 1831), pertencente à família Caviidae, consiste em uma espécie da biodiversidade da Caatinga considerada fonte de proteína de origem animal alternativa para população local. Estudos realizados com essa espécie limitam-se a sua descrição morfológica e comportamental, com relatos sobre a morfofisiologia do sistema reprodutor. Entretanto, trabalhos com aplicação de biotécnicas reprodutivas são escassos, além de ser inexistente o relato de criopreservação de gametas masculinos. O objetivo do presente estudo foi criopreservar, pela primeira vez, espermatozoides de preá utilizando dois crioprotetores (glicerol vs dimetilsulfoxido – DMSO). Para tanto, foram usados 12 complexos testículo-epidídimo de preás adultos cedidos pelo Centro de Multiplicação de Animais Silvestres da UFERSA. Após a coleta, os complexos foram levados ao laboratório envolvidos em gases umedecidas com solução fisiológica aquecida a 37° C, acondicionadas em isopor. A coleta dos espermatozoides epididimários se deu pelo método de lavagem retrógrada com o diluente Tris (1,5 mL por epidídimo). Após a recuperação dos espermatozoides, estes foram avaliados em relação à motilidade (%), vigor (0 – 5), viabilidade (%), funcionalidade de membrana pelo teste hiposmótico (%), e concentração espermática ($\times 10^6$). Após as avaliações, a amostra foi dividida em duas alíquotas, que foram diluídas em Tris acrescido de 20% de gema de ovo, resfriadas até atingir uma temperatura de 5° C, e adicionadas dos crioprotetores glicerol e DMSO em concentração final de 6%, atingindo-se uma concentração de 100×10^6 espermatozoides/mL. Posteriormente, foram envasadas em palhetas de 0,25 mL e criopreservadas em nitrogênio líquido, procedendo-se a descongelação em banho-maria por 1 minuto a 37 °C após uma semana. Os dados foram expressos em média e erro padrão e submetidos a ANOVA seguido do teste t de Student ($P < 0,05$), com exceção do vigor que foi avaliado pelo teste Mann-Whitney ($P < 0,05$). Os resultados para as amostras frescas foram: motilidade $96,3 \pm 1,3$ %, vigor $4,9 \pm 0,1$, viabilidade $85,6 \pm 2,8$ %, funcionalidade de membrana $66,4 \pm 3,0$ %, concentração total $980,8 \pm 113,7 \times 10^6$ espermatozoides/mL. Após, a descongelação, os melhores resultados foram obtidos no uso do glicerol ($P < 0,05$), sendo motilidade $70,8 \pm 3,8$ %, vigor $3 \pm 0,1$, viabilidade $68,4 \pm 4$ %, funcionalidade de membrana $42,45 \pm 7,06$, em comparação ao DMSO, no qual obteve-se motilidade $5,4 \pm 1$ %, vigor $1 \pm 0,2$, viabilidade $5,3 \pm 1,2$ %, e funcionalidade de membrana $9,1 \pm 1,1$ %. Em conclusão, sugere-se o uso do diluente Tris acrescido de 20% de gema de ovo e 6% de glicerol para a criopreservação de espermatozoides epididimários de preás (*Galea spixii*).

Palavras-chave: preá, criopreservação, glicerol, dimetilsulfoxido.

Keywords: Spix's yellow-toothed caviar, cryopreservation, glycerol, dimethylsulfoxide.

XXI Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 2015.

Longevidade de espermatozoides epididimários de preás (*Galea spixii* Wagler, 1831) utilizando diferentes diluentes*Longevity of epididymal sperm from Spix's yellow-toothed cavies (*Galea spixii* Wagler, 1831) using different diluents.***Keilla Moreira Maia¹, Andréia Maria da Silva¹, José Artur Brilhante Bezerra¹, Livia Batista Campos, Erica Camila Gurgel¹, Alexandre Rodrigues Silva¹**¹ Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal, UFERSA

Mossoró, RN, Brasil

[*keillamaia@hotmail.com](mailto:keillamaia@hotmail.com)

O preá (*Galea spixii* Wagler, 1831) é uma espécie silvestre de ampla ocorrência no bioma Caatinga, que pode ser utilizada como modelo experimental para outros roedores ameaçados de extinção. Desse modo, a recuperação de espermatozoides diretamente da cauda do epidídimo, pode ser realizada permitindo a obtenção de células morfológicamente viáveis e aptas a fecundar o oócito. Entretanto, é desconhecido o efeito de diluentes sobre os parâmetros espermáticos nessa espécie. Tal informação seria importante para fomentar estudos de conservação de germoplasma masculino em roedores. Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a ação dos diluentes Tris e Tes sobre a longevidade dos espermatozoides epididimários de preás, por meio do teste de termorresistência (TTR). Para tanto, foram utilizados 9 complexos testículo-epidídimo de preás adultos cedidos pelo Centro de Multiplicação de Animais Silvestres da UFERSA. Após a coleta dos complexos, estes foram levados ao laboratório, envolvidos em gases umedecidas com solução fisiológica aquecida a 37° C e acondicionados em isopor. A coleta dos espermatozoides foi feita pelo método de flutuação, na qual os epidídimos tiveram as caudas fatiadas, das quais, uma foi imersa em 3 mL de tampão Tris, e a outra, em 3 mL de Tes, por cinco minutos. Após a recuperação dos espermatozoides, estes foram submetidos ao TTR no qual foram mantidos em banho-maria a 37 °C durante 3 horas. Procederam-se avaliações de motilidade (%) e vigor espermático (0-5) aos 0, 15, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos de incubação. Os resultados foram expressos em média e erro padrão, e analisados por ANOVA seguida do teste t de Student ($P < 0,05$), exceto o vigor que foi avaliado pelo teste de Mann-Whitney ($P < 0,05$). Os resultados dos parâmetros avaliados com o diluente TRIS durante o TTR foram: $95 \pm 1,7\%$ e $4,7 \pm 0,2$ (0 min); $97,2 \pm 1,5\%$ e 5 ± 0 (15 min); $88,3 \pm 2,2\%$ e $4,8 \pm 0,2$ (30 min); $76,1 \pm 3,9\%$ e $3,3 \pm 0,3$ (60 min); $43,3 \pm 4,7\%$ e $2,3 \pm 0,2$ (90 min); $29,4 \pm 3,9\%$ e $1,8 \pm 0,3$ (120 min); $18,8 \pm 2,5\%$ e $1,1 \pm 0,1$ (150 min); $10 \pm 1,2\%$ e 1 ± 0 (180 min), para motilidade e vigor, respectivamente. No tocante às amostras diluídas em Tes, verificou-se um efeito negativo deste diluente já imediatamente após a recuperação espermática. Além disso, a longevidade espermática das amostras diluídas em Tes foram de apenas 60 min, sendo apresentados os seguintes valores de motilidade e vigor $36,7 \pm 12\%$ e $1 \pm 0,2$ (0 min); $17,8 \pm 9,4\%$ e $0,9 \pm 0,3$ (15 min); $1,7 \pm 1,8\%$ e $0,2 \pm 0,1$ (30 min); $0,6 \pm 0,6\%$ e $0,1 \pm 0,1$ (60 min), respectivamente. Os resultados indicam que o diluente Tris foi mais eficiente que o Tes ($P < 0,05$) quanto a manutenção dos parâmetros espermáticos de preás em todos os momentos de avaliação durante o TTR, possibilitando, inclusive, uma longevidade por um período mais extenso. Em conclusão, indica-se o uso do diluente Tris para a recuperação e a manutenção da longevidade de espermatozoides epididimários de preás (*Galea spixii*).

Palavras-Chave: espermatozoides epididimários, preá, teste de termorresistência, Tris.**Key words:** epididymal sperm, *Spix's yellow-toothed cavies*, term resistance test, Tris.

XIX Seminário de Iniciação Científica, 2013.

Validação de Sondas Moleculares Fluorescentes na Avaliação da Viabilidade de Espermatozoides Epididimários de Preás (*Galea spixii spixii*)

Validation of Molecular Probes for Fluorescent Viability Assessment of epididymal sperm from caviés (Galea spixii spixii)

A.M. Silva^{1*}, P.C. Sousa¹, J.A.B. Bezerra¹, E.A.A. Santos¹, L.B. Campos, E.C.G. Praxedes, A.L.P. Souza, A.R. Silva^{1}**

¹Laboratório Conservação de Germoplasma Animal, DCAN – UFERSA

***Estudante IC PIBIC, **Orientador. E-mail: andreia.m.silva@hotmail.com**

No intuito de aprimorar os conhecimentos acerca dos aspectos reprodutivos de preás da Caatinga (*Galea spixii spixii*), o objetivo deste trabalho foi validar sondas fluorescentes para avaliação de espermatozoides epididimários nesta espécie. Após abate programado no Centro de Multiplicação de Animais Silvestres da UFERSA, foram coletados complexos testículos-epidídimos de três animais. As caudas dos epidídimos foram fatiadas e os espermatozoides coletados por flutuação, utilizando-se 3 mL de TES. Em seguida, foram avaliadas quanto motilidade (0-100%) e função de membrana (%). Para validação das sondas fluorescência, a amostra foi dividida em duas alíquotas: uma mantida viável e a outra submetida à congelamento rápida em nitrogênio líquido, seguida de descongelamento lenta (*flash frozen*) por três vezes consecutivas. Foram avaliadas alíquotas com as seguintes proporções de espermatozoides frescos e espermatozoides submetidos ao *flash frozen*: 100:0 (T100), 50:50 (T50) e 0:100 (T0). Em seguida, as amostras foram imersas em solução com a associação dos seguintes fluoróforos: iodeto de propídio (PI), Hoechst (H-342), e CMXRos (MITO Tracker® red), e avaliadas em microscópio de epifluorescência quanto a viabilidade da membrana plasmática (MP) e o potencial de membrana mitocondrial (PMM). De acordo com a fluorescência emitida por cada sonda, foram verificadas quatro categorias de espermatozoides, Azul/Vermelho (A/V) – MP intacta e com PMM; Azul/- (A/-) – MP intacta e sem PMM; Vermelho/Vermelho (V/V) – MP lesada e com PMM; e Vermelho/- (V/-) – MP lesada e sem PMM. Na validação, verificou-se que a associação das sondas PI, H-342 e MITO, permitiu a avaliação da MP e do PMM em espermatozoides de preás. No tratamento T100, foram obtidos os seguintes valores: motilidade 70,0% com 66% de função de membrana, sendo detectados os seguintes padrões de fluorescência: 82% A/V, 6% A/-, 0% V/V, 12% V/-. Para o T50, obteve-se 5% de motilidade 5,0% e 56% de função de membrana, sendo verificados pela fluorescência, 41% A/V, 9% A/-, 2% V/V, e 48% V/-. No T0, todos os parâmetros foram 0% e na avaliação com sonda foi 100% de V/-. A partir destes resultados, a técnica foi posta à prova em amostras de espermatozoides obtidas de nove diferentes animais, que apresentaram $36,6 \pm 11,9\%$ de motilidade com $64,6\% \pm 3,65$ de membranas funcionais. Para as mesmas amostras, a avaliação por fluorescência identificou $40,37 \pm 10,90\%$ A/V, $30 \pm 9,64\%$ A/-, $29,00 \pm 27,00\%$ V/V, e $46,25 \pm 7,80\%$ V/-. Estes resultados, denotam a eficiência do uso de sondas fluorescentes para avaliação da integridade de membrana e do potencial de membrana mitocondrial em espermatozoides epididimários de preás, sendo sugerido que esta análise poderia ser incorporada à rotina de avaliação andrológica na espécie.

Palavras-chave: sondas fluorescentes; roedor; espermatozoide.

Keywords: fluorescent probes, rodents, sperm.

Apoio: CNPQ.