

Efeitos do alojamento de cachacos sobre a biometria e a histologia testiculares e epididimárias e a qualidade espermática

Gabriela Marques de Rezende¹, Thiago Bernardino de Almeida², Laura Nataly Garcia Oliveiros¹, Samara Cristine Costa Pinto¹, Sabrina Moraes dos Santos³, Leonardo Batissaco¹, Humberto Eustáquio Coelho³, Adroaldo José Zanella², Rubens Paes de Arruda⁴, Eneiva Carla de Carvalho Celeghini^{1*}

¹Laboratório de Ensino e Pesquisa em Patologia da Reprodução - Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal - Departamento de Reprodução Animal - FMVZ-USP, Pirassununga, SP; ²Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal - FMVZ-USP, Pirassununga, SP; ³Medicina Veterinária, Universidade de Uberaba (UNIUBE), Uberaba, MG; ⁴Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia - Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal - Departamento de Reprodução Animal - FMVZ-USP, Pirassununga, SP
*E-mail: celeghin@usp.br

No Brasil predomina o sistema de confinamento intensivo para machos reprodutores suínos, sistema com restrição de espaço e sem interação ambiental, o qual ocasiona situações estressantes, que podem desencadear desequilíbrio sistêmico no animal e provocar queda no desempenho reprodutivo. Neste sentido, este estudo teve como objetivo avaliar se o alojamento dos cachacos com mais espaço e enriquecimento ambiental, comparado ao sistema intensivo, pode ter efeito na qualidade do sêmen, nas características biométricas e histológicas dos testículos e epidídimos e na qualidade espermática da cauda do epidídimo. Para isso, foram utilizados 25 machos híbridos (F1: Large White X Landrace) submetidos, aos 5 meses de idade, a um período de condicionamento de colheita de sêmen. Aos 10 meses de idade foram distribuídos em três tipos de alojamentos: animais em celas (1,61 m²; n=9), em baias individuais (4,62 m²; n=8) e em baias individuais com enriquecimento ambiental (4,62 m²), recebendo escovação, banho e feno (n=8) duas vezes ao dia, a fim de minimizar o estresse e promover maior bem-estar. O sêmen dos cachacos foi colhido e avaliado (volume, concentração, motilidade, vigor e morfologia) imediatamente antes da distribuição nos tratamentos (controle) e após 9 semanas do início do tratamento. Foram mantidos nestas condições por 30 semanas e, ao término deste período, submetidos à eutanásia e remoção dos testículos e epidídimos. Foram realizadas biometrias testiculares e epididimárias por paquímetro (comprimento, largura e espessura) e o volume testicular foi determinado. Foram dissecados testículos e epidídimos e colhidas amostras para exame histopatológico. As lâminas histológicas foram avaliadas e classificadas em escores considerando os aspectos de degeneração tissular do parênquima testicular (0 a 5) e do epidídimo (0 ou 1); também foram avaliadas por sistema computadorizado utilizando o *software* image J. Nos testículos foram consideradas: área do túbulo seminífero (µm²), epitélio seminífero (µm²), área do lúmen (µm²) e a relação epitélio/túbulo seminífero e nos epidídimos: área total do ducto epididimário (µm²), epitélio epididimário (µm²), área do lúmen (µm²) e a relação epitélio/ducto epididimário. Amostras de espermatozoides da cauda do epidídimo foram colhidas, pela técnica de squeeze, e avaliadas quanto ao volume (µL), concentração (n. spzt/mL), motilidade (%), vigor (escore 1 a 5) e morfologia (%). Os dados foram analisados quanto à normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk. Foi realizada ANOVA e utilizado o teste Tukey-Kramer como *posthoc*. O nível de significância adotado foi de 5%. Verificou-se que os animais mantidos em baia apresentaram maior área do epitélio epididimário (p=0,01) do que os outros grupos. Em adição, os animais mantidos em cela apresentaram maior lúmen do ducto epididimário (p=0,05) do que os animais mantidos em baia enriquecida. Também foi observado menor percentual de defeitos espermáticos totais, excluindo-se gotas protoplasmáticas distais, dos espermatozoides epididimários, para os cachacos em baia enriquecida (P=0,03) do que para aqueles mantidos em cela. Pode-se concluir que melhorias nas condições de alojamento dos reprodutores suínos, durante 30 semanas, apresenta poucos efeitos benéficos sobre as características reprodutivas; no entanto, este trabalho contribuiu com análises exploratórias e iniciais em uma área de pesquisa cujas informações ainda são escassas utilizando-se de métodos e ferramentas que ainda não são descritas pela literatura em cachacos.

Palavras-chaves: Suínos. Epidídimos. Testículos. Bem-estar. Alocação.

Effects of boars housing on testicular and epididymal biometrics histology and sperm quality

Gabriela Marques de Rezende¹, Thiago Bernardino de Almeida², Laura Nataly Garcia Oliveiros¹, Samara Cristine Costa Pinto¹, Sabrine Moraes dos Santos³, Leonardo Batissaco¹, Humberto Eustáquio Coelho³, Adroaldo José Zanella², Rubens Paes de Arruda⁴, Eneiva Carla de Carvalho Celeghini^{1*}

¹Laboratório de Ensino e Pesquisa em Patologia da Reprodução - Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal - Departamento de Reprodução Animal - FMVZ-USP, Pirassununga, SP; ²Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal - FMVZ-USP, Pirassununga, SP; ³Medicina Veterinária, Universidade de Uberaba (UNIUBE), Uberaba, MG; ⁴Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia - Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal - Departamento de Reprodução Animal - FMVZ-USP, Pirassununga, SP
*E-mail: celeghin@usp.br

In Brazil, the intensive confinement system prevails for male breeding pigs, causing stressful situations that can trigger systemic imbalance in the animal and cause a drop in reproductive performance. In this sense, this study aimed to evaluate whether housing boars with greater spatial and environmental enrichment, compared to the intensive system, can have an effect on semen quality, on the biometric and histological characteristics of the testes and epididymis, and on sperm quality of the boar's tail. For this, 25 hybrid males (F1: Large White X Landrace) were submitted, at 5 months of age, to a conditioning period for semen collection. At 10 months of age, they were divided into three types of housing: animals in pens (1.61 m²; n=9), in individual pens (4.62 m²; n=8) and in individual pens with environmental enrichment (4.62 m²), receiving brushing, bathing and hay (n=8) twice a day, in order to minimize stress and promote greater well-being. The boar semen was collected and evaluated (volume, concentration, motility, vigor and morphology) immediately before distribution in the treatments (control) and 9 weeks after the beginning of the treatment. They were kept under these conditions for 30 weeks and, at the end of this period, they were euthanized and the testes and epididymis removed. Testicular and epididymal biometrics were performed using a caliper (length, width and thickness) and testicular volume was determined. Testicles and epididymis were dissected and samples were collected for histopathological examination. The histological slides were evaluated and classified into scores considering the aspects of tissue degeneration of the testicular parenchyma (0 to 5) and of the epididymis (0 or 1); were also evaluated by a computer system using the image J software. In the testes were considered: seminiferous tubule area (μm²), seminiferous epithelium (μm²), lumen area (μm²) and the epithelium/seminiferous tubule ratio and in the epididymis: total area of the epididymal duct (μm²), epididymal epithelium (μm²), lumen area (μm²) and the epithelium/epididymal duct ratio. Sperm samples from the tail of the epididymis were collected using the squeeze technique and evaluated for volume (μL), concentration (n. spz/mL), motility (%), vigor (score 1 to 5) and morphology (%). Data were analyzed for residual normality using the Shapiro-Wilk test. ANOVA was performed and the Tukey-Kramer test was used as posthoc. The significance level adopted was 5%. It was found that the animals kept in the pen had a greater area of epididymal epithelium (p=0.01) than the other groups. In addition, the animals kept in the cage had greater epididymal duct lumen (p=0.05) than the animals kept in the enriched pen. A lower percentage of total sperm defects was also observed, excluding distal protoplasmic drops of epididymal sperm, for boars in an enriched stall (P=0.03) than for those kept in a cage. It can be concluded that improvements in housing conditions for swine breeders, during 30 weeks, have few beneficial effects on reproductive traits; however, this work contributed exploratory and initial analyzes in an area of research for which information is scarce using methods and tools that are not yet described in the literature on boars.

Keywords: Swine. Epididymis. Testicles. Welfare. Allocation.

Fixação de Células Espermáticas de Suínos em Solução Líquida

Jean Carlo V. Faccin¹, Janine Camargo², José Victor Braga³, Débora Lis Albring Dartora⁴, Ricardo Zanella², Mariana Groke Marques^{1,5}

¹Programa de Pós-Graduação em Produção e Sanidade Animal, Instituto Federal Catarinense, Concórdia - SC,

²Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo - RS, ³Programa de pós-graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas - RS, Instituto Federal Catarinense, Campus Concórdia, Concórdia - SC, ⁵Embrapa Suínos e Aves, Concórdia - SC

*E-mail: mariana.marques@embrapa.br

Metodologias empregadas para avaliação espermática estão sendo aprimoradas para serem realizadas imediatamente após as coletas. A utilização do sistema CASA em larga escalas nas centrais de processamento de sêmen permitiu uma melhor acurácia em relação as avaliações de motilidade e concentração espermáticas. No entanto, ainda existem algumas dificuldades com avaliações de outras lesões espermáticas mais específicas, principalmente quando as amostras necessitam ser transportadas a longas distâncias para avaliações por citometria de fluxo, por exemplo. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes soluções de fixação, em suspensão, de amostras espermáticas coletadas a campo, visando obter-se uma solução ideal, que mantenha sem alteração das estruturas espermáticas durante o transporte. Para tanto foram utilizadas doses inseminantes de 5 suínos, após 3 dias sob refrigeração, provenientes de uma única central de disseminação genética. Os fixadores escolhidos para a realização do teste eram: Paraformoldeído a 4% (PF), Metanol (M) e uma solução 3:1 de Álcool etílico e Ácido Acético Glacial (AL/AC). Foram realizadas diluições em diferentes concentrações para avaliar a ação do fixador nas células espermáticas. As diluições foram de 50%, 25%, 12,5% e 6,25% para as amostras onde foi utilizado Metanol e AL/AC como fixadores. Nas amostras onde foi utilizado o PF, as concentrações foram de 2%, 1%, 0,5% e 0,25%. O sêmen diluído permaneceu em contato com o fixador por 10 minutos, sendo este então centrifugado por 4 minutos a 1400 x g e o sedimento resuspenso em diluidor comercial para sêmen. Como controle foram utilizadas amostras não fixadas das mesmas doses. A avaliação da ação dos fixadores na manutenção da integridade da membrana plasmática foi realizada através de citometria de fluxo com a utilização de sonda fluorescente Iodeto de propídio (PI; Sigma-Aldrich Co., Saint Louis Missouri, USA; 10µg/mL). As amostras foram analisadas usando o citômetro de fluxo BD AccuriC6 (Becton & Dickson, Santiago, Chile), utilizando-se FL-2 (585±40 nm). Foram avaliados 10.000 eventos. A dispersão direta (FSC) e a dispersão lateral (SSC) foram usadas para identificar a população de espermatozoides e excluir debris. As análises estatísticas foram realizadas no programa Medcalc. Por não terem distribuições normal, as comparações entre as concentrações de fixadores foram realizadas pelo teste Kruskal-Wallis com teste de Dunn como pós teste. As análises de correlação foram realizadas pelo teste de correlação de Spearman. Para todas as análises foi considerado um nível de significância de 5%. Os espermatozoides fixados com PF, nas concentrações de 0,25% (13,86% ± 1,32) e 0,5% (23,15% ± 4,10) não diferiram do Controle (7,32% ± 1,33%) em relação a porcentagem de lesão de membrana. No entanto, as amostras fixadas com 1% (34,88% ± 5,11) e 2% (47,92% ± 5,59) apresentaram aumento nos danos de membrana (P<0.0006). Foi observado uma correlação positiva com o aumento da concentração de PF com os danos de membrana espermática (r=0.91 P=0.0001). Os espermatozoides fixados com Metanol, não apresentaram alterações apenas na concentração de 6,25% (10,74% ± 2,99) não tendo diferido do Controle. As outras concentrações apresentaram altos índices de lesão, sendo 12,5% (60,62% ± 4,14); 25% (64,24% ± 3,32) e 50% (36,82% ± 5,15). Além disso, conforme a concentração do Metanol aumentou, os danos de membrana também aumentaram (r=0.63 P=0.0006). Já para o AL/AC, todas as concentrações testadas apresentaram índices de lesão maiores que o Controle, sendo 6,25% (54,22% ± 2,03); 12,5% (60,26% ± 1,09); 25% (50,68% ± 1,13) e 50% (49,16% ± 3,88). Diante do exposto, pode-se inferir que tanto o paraformoldeído nas concentrações de 0,25 e 0,5% e o Metanol na concentração de 6,25%, quando utilizados como fixadores para espermatozoides suínos em suspensão, são eficientes na manutenção da integridade da membrana plasmática.

Palavras-chave: Paraformoldeído; Metanol; Álcool etílico; Ácido Acético Glacial; Membrana plasmática.

Fixation of Swine Sperm Cells in Liquid Solution

Jean Carlo V. Faccin¹, Janine Camargo², José Victor Braga³, Débora Lis Albring Dartora⁴, Ricardo Zanella², Mariana Groke Marques^{1,5}

¹Programa de Pós-Graduação em Produção e Sanidade Animal, Instituto Federal Catarinense, Concórdia - SC,

²Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo - RS, ³Programa de pós-graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas - RS, Instituto Federal Catarinense, Campus Concórdia, Concórdia - SC, ⁵Embrapa Suínos e Aves, Concórdia - SC

*E-mail: mariana.marques@embrapa.br

The sperm evaluation process are being improving to be carried out immediately after semen collections. The use of the CASA system in large scales in the semen processing centers allowed to improve the accuracy in the evaluations of sperm motility and concentration. However, there are still some drawbacks with specific sperm lesions evaluations, especially when samples needed to be transported for long distances to be evaluated by flow cytometry, for example.

Therefore, the objective of this work was to evaluate different fixation solutions, in suspension, of sperm samples collected in the field, aiming to obtain an ideal solution, which will preserve the sperm structures during transport. For this purpose, inseminating doses of 5 boars maintained for 3 days under refrigeration, from a single genetic dissemination center were used. The fixatives chosen for the test were: 4% Paraformaldehyde (PF), Methanol (M) and a 3:1 solution of Ethyl Alcohol and Glacial Acetic Acid (AL/AC). Dilutions were performed at different concentrations to evaluate the action of the fixative on sperm cells. Dilutions were 50%, 25%, 12.5% and 6.25% for samples where Methanol and AL/AC were used as fixatives. In the samples where PF was used, the concentrations were 2%, 1%, 0.5% and 0.25%. The diluted semen remained in contact with the fixative for 10 minutes, which was then centrifuged for 4 minutes at 1400 x g and the sediment was resuspended in a commercial semen extender. As controls, unfixed samples of the same doses were used. The evaluation of the action of fixatives in maintaining the integrity of the plasma membrane was performed by flow cytometry using a fluorescent probe of propidium iodide (PI; Sigma-Aldrich Co., Saint Louis Missouri, USA; 10µg/mL). Samples were analyzed using the BD AccuriC6 flow cytometer (Becton & Dickson, Santiago, Chile), using FL-2 (585±40 nm). For that 10,000 events were evaluated. Direct scatter (FSC) and side scatter (SSC) were used to identify the sperm population and exclude contaminants. Statistical analyzes were performed using the Medcalc program. As they do not have normal distributions, comparisons between fixative concentrations were performed using the Kruskal-Wallis test with Dunn's test as a post-test. Correlation analyzes were performed using the Spearman correlation test. For all analyses, a significance level of 5% was considered. Spermatozoa fixed with FP, at concentrations of 0.25% (13.86% ± 1.32) and 0.5% (23.15% ± 4.10) did not differ from the Control (7.32% ± 1.33%) in relation to the percentage of membrane injury. However, samples fixed with 1% (34.88% ± 5.11) and 2% (47.92% ± 5.59) showed an increase in membrane damage (P<0.0006). A positive correlation was observed between the increase in PF concentration and sperm membrane damage (r=0.91 P=0.0001). Spermatozoa fixed with methanol showed no changes, only at the concentration of 6.25% (10.74% ± 2.99) and did not differ from the control. The other concentrations showed high rates of injury, being 12.5% (60.62% ± 4.14); 25% (64.24% ± 3.32) and 50% (36.82% ± 5.15). Furthermore, as methanol concentration increased, membrane damage also increased (r=0.63 P=0.0006). As for AL/AC, all concentrations tested showed injury rates higher than the control, being 6.25% (54.22% ± 2.03); 12.5% (60.26% ± 1.09); 25% (50.68% ± 1.13) and 50% (49.16% ± 3.88). In view of the above, it can be inferred that both Paraformaldehyde at concentrations of 0.25 and 0.5% and Methanol at a concentration of 6.25%, when used as fixatives for swine sperm in suspension, are efficient in maintaining membrane integrity. plasma.

Keywords: Paraformaldehyde; Methanol; Ethyl Alcohol; Glacial Acetic Acid ; Plasma Membrane.