UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**CRIOPRESERVAÇÃO E FERTILIDADE DE
ESPERMATOZÓIDES RECUPERADOS DA CAUDA DO
EPIDÍDIMO DE GARANHÕES**

GABRIEL AUGUSTO MONTEIRO

**BOTUCATU – SP
Fevereiro/2010**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**CRIOPRESERVAÇÃO E FERTILIDADE DE
ESPERMATOZÓIDES RECUPERADOS DA CAUDA DO
EPIDÍDIMO DE GARANHÕES**

GABRIEL AUGUSTO MONTEIRO

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-graduação em
Medicina Veterinária para obtenção do
título de Mestre.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa

BOTUCATU - SP

Fevereiro/2010

Nome do Autor: Gabriel Augusto Monteiro

Título: CRIOPRESERVAÇÃO E FERTILIDADE DE ESPERMATOZÓIDES DE
GARANHÕES RECUPERADOS DA CAUDA DO EPIDÍDIMO

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa
Presidente e Orientador
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Marco Antonio Alvarenga
Membro
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP - Botucatu

Prof. Dr^a. Fabiana Ferreira de Souza
Membro
Departamento de Cirurgia e Anestesia Veterinária
Universidade de Franca - Franca

Data da Defesa: 22 de fevereiro de 2010

***Dedico este trabalho aos meus pais e a
minha irmã, pela educação e incentivo
que me permitiram a realização de um
dos meus principais sonhos.***

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter colocado pessoas tão especiais no meu caminho.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP, Campus de Botucatu pela oportunidade concedida.

À Universidade Federal de Viçosa, pela minha formação acadêmica fundamental em meus avanços profissionais.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela bolsa de estudo e auxílio financeiro concedidos para realização do projeto de pesquisa.

Ao Professor Titular Frederico Ozanam Papa, pela amizade e ensinamentos preciosos desde a residência, exemplo de dedicação e profissionalismo, por ter confiado em minha capacidade profissional e minhas idéias durante esses anos.

À Professora Maria Verônica de Souza, pela amizade e gargalhadas durante nossa convivência e todos os ensinamentos e conselhos.

Aos meus pais, Ana Rita e José Carlos, meu alicerce, pelo amor incondicional e apoio depositado em todas minhas escolhas.

Aos Funcionários do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Cris, Raquel, Cida, Márcio, Tico, Zé Carlos, Edilson, Miguel e Walter, pelos bons momentos de convívio e pela amizade.

Aos Professores do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária pelo grande apoio, amizade, ensinamentos e conselhos ao longo dos últimos anos.

Ao Dr. José Carlos Martin, pela amizade e ajuda fundamental na realização em todas as etapas do projeto de pesquisa.

Ao Haras Itapuã em nome de todos os seus funcionários, pelo grande apoio e auxílio pela disponibilidade de garanhões para a prática experimental.

A Priscilla, pela amizade, companheirismo e paciência em todas as fases do projeto de pesquisa.

A minha família em Botucatu, fundamentais em todos os momentos: Andreza, Ana Paula, Fernanda, Jair, Simone, Giovana, Priscilla, Aline, Leandro, Natalia, Nina, Camila, Dani, Angélica e Stefani.

Aos Pós-Graduandos do Ceran: André, Bió, Zé, Camila, Nina, Vitor, Bruno, Rosiára e Ian, pela ajuda, convivência, troca de conhecimentos, amizade que tornaram os dias tão agradáveis durante esses anos.

Aos participantes do check ligament que mesmo de longe nossa amizade continua sendo muito importante.

Aos residentes, Aline, Ana Carolina, Ana Cristina, Bilúca, Elisa, Janaína, João Rafael, Rodrigo Carneiro e Renata (Alfafa) pela amizade, ajuda e troca de conhecimento durante esses anos.

Aos Colegas Pós-Graduandos pelo convívio e amizade por todos esses anos.

A todas as pessoas que de alguma forma ajudaram na elaboração e desenvolvimento deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS

μL: microlitro

μm/s: micrômetro por segundo

CASA: análise computadorizada de movimento espermático

cm: centímetro

D: direito

DEF: defeitos morfológicos

E: esquerdo

EDTA: etilenodiamino tetra-acético

EJ: ejaculado

EP: recuperados do epidídimo

g: força de centrifugação

GnRH: hormônio liberador de gonadotrofina

h: hora

HTMO: Hamilton Thorne Research

ICSI: injeção intracitoplasmática de espermatozóide

IMP: integridade de membrana plasmática

MESA: aspiração microcirúrgica de espermatozóides do epidídimo

mg: miligrama

mL: mililitro

mm³: milímetro cúbico

MP: motilidade progressiva

MT: motilidade total

°C: graus Celsius

PESA: aspiração percutânea de espermatozóides do epidídimo

PS: plasma seminal

RAP: espermatozóides rápidos

TA: temperatura ambiente

VCL: velocidade curvilínea

VSL: velocidade linear progressiva

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Valores médios e desvios padrão de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade linear progressiva (VSL), velocidade curvilínea (VCL), espermatozóides rápidos (RAP) e integridade de membrana plasmática (IMP) imediatamente após a recuperação espermática nos grupos: controle (0 hora), armazenados à 5°C (5°C-06h, 5°C-12h, 5°C-18h, 5°C-24h e 5°C-30h) e armazenados à temperatura ambiente (TA-6h, TA-12h, TA-18h, TA-24h e TA-30).....27
- Tabela 2** - Valores médios e desvios padrão de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade linear progressiva (VSL), velocidade curvilínea (VCL), espermatozóides rápidos (RAP) e integridade de membrana plasmática (IMP) após centrifugação e a ressuspensão com diluente Botu-Crio[®] nos grupos: controle (0 hora), armazenados à 5°C (5°C-06h, 5°C-12h, 5°C-18h, 5°C-24h e 5°C-30h) e armazenados à temperatura ambiente (TA-6h, TA-12h, TA-18h, TA-24h e TA-30).....28
- Tabela 3** - Valores médios e desvios padrão de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade linear progressiva (VSL), velocidade curvilínea (VCL), espermatozóides rápidos (RAP) e integridade de membrana (IMP) após a descongelação, nos grupos: controle (0 hora), armazenados à 5°C (5°C-06h, 5°C-12h, 5°C-18h, 5°C-24h e 5°C-30h) e armazenados à temperatura ambiente (TA-6h, TA-12h, TA-18h, TA-24h e TA-30).....28
- Tabela 4** - Valores médios e desvios padrão de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade linear progressiva (VSL), velocidade curvilínea (VCL), espermatozóides rápidos (RAP) e espermatozóides com defeitos morfológicos (DEF) logo após a recuperação nos grupos EJ-0h, EP-0h e EP-24h.....34

Tabela 5 – Valores médios e desvios padrão de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade linear progressiva (VSL), velocidade curvilínea (VCL), espermatozóides rápidos (RAP) e integridade de membrana plasmática (IMP) após a centrifugação e a ressuspensão com diluente de congelamento (Botu-Crio[®]) nos grupos EJ-0h, EP-0h e EP-24h.....34

Tabela 6 – Valores médios e desvios padrão de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade linear progressiva (VSL), velocidade curvilínea (VCL), espermatozóides rápidos (RAP) e integridade de membrana plasmática (IMP) pós-descongelamento nos grupos EJ-0h, EP-0h e EP-24h.....34

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Etapas que antecedem a recuperação de espermatozóides pela técnica de flutuação consistem: separação da cauda do epidídimo e remoção dos tecidos tecido conjuntivo que recobre a cauda do epidídimo (a); incisões para proporcionar a migração dos espermatozóides do lúmen da cauda do epidídimo (b) e repouso para migração dos espermatozóides para o meio diluente (c).....7
- Figura 2** – Etapas que antecedem a recuperação de espermatozóides pela técnica de fluxo retrógrado consistem: separar o complexo testículo-epidídimo (a); remover o tecido conjuntivo que recobre a cauda do epidídimo (b) e desfazer os contornos da cauda do epidídimo (c).....8
- Figura 3** – Recuperação de sêmen do epidídimo pela técnica de fluxo retrógrado: após a secção do ducto da cauda do epidídimo em três partes ele é estendido na posição vertical e o diluente injetado no lúmen até a outra extremidade (a, b, c).....8
- Figura 4** – Esquema da metodologia utilizada no experimento I.....19
- Figura 5** – Esquema da metodologia utilizada no experimento II.....22
- Figura 6** – Avaliação da porcentagem de espermatozóides móveis (Motilidade Total), recuperados do epidídimo pré-congelação (após a ressuspensão com diluente de congelação; A) e pós-descongelação (B) nos grupos: controle (0 hora), armazenados a temperatura ambiente e a 5°C por 6, 12, 18, 24 e 30 horas antes da recuperação espermática. *diferem significativamente do grupo controle $p < 0,05$29
- Figura 7** – Avaliação da porcentagem de espermatozóides com motilidade progressiva, recuperados do epidídimo pré-congelação (após a ressuspensão com diluente de congelação; A) e pós-descongelação (B) nos grupos: controle (0

hora), armazenados a temperatura ambiente e a 5°C por 6, 12, 18, 24 e 30 horas antes da recuperação espermática. *diferem significativamente do grupo controle $p<0,05$).....30

Figura 8 – Avaliação da Velocidade Linear Progressiva (VSL), dos espermatozóides recuperados do epidídimo pré-congelação (após a ressuspensão com diluente de congelação; A) e pós-descongelação (B) nos grupos: controle (0 hora), armazenados a temperatura ambiente e a 5°C por 6, 12, 18, 24 e 30 horas antes da recuperação espermática. *diferem significativamente do grupo controle $p<0,05$30

Figura 9 – Avaliação da Velocidade Curvilínea (VCL), dos espermatozóides recuperados do epidídimo pré-congelação (após a ressuspensão com diluente de congelação; A) e pós-descongelação (B) nos grupos: controle (0 hora), armazenados a temperatura ambiente e a 5°C por 6, 12, 18, 24 e 30 horas antes da recuperação espermática. *diferem significativamente do grupo controle $p<0,05$31

Figura 10 – Avaliação da porcentagem de espermatozóides rápidos (RAP), recuperados do epidídimo (após a ressuspensão com diluente de congelação; A) e após descongelação (B) nos grupos: controle (0 hora), armazenados a temperatura ambiente e a 5°C por 6, 12, 18, 24 e 30 horas antes da recuperação espermática. *diferem significativamente do grupo controle $p<0,05$ 32

Figura 11 – Avaliação da porcentagem de espermatozóides com integridade de membrana plasmática (IMP), recuperados do epidídimo (após a ressuspensão com diluente de congelação; A) e pós-descongelação (B) nos grupos: controle (0 hora), armazenados a temperatura ambiente e a 5°C por 6, 12, 18, 24 e 30 horas antes da recuperação espermática. *diferem significativamente do grupo controle $p<0,05$32

Figura 12 – Média do número de espermatozóides recuperados com vagina artificial (Ejaculado), dos epidídimos direitos (Epidídimos D), dos epidídimos

esquerdos (Epidídimos E) e soma dos epidídimos direito e esquerdo
(Epidídimos D + E).....33

Figura 13 – Média do percentual da motilidade total (A), motilidade progressiva (B) e
espermatozóides rápidos (C) obtidos do epidídimo logo após recuperação,
após a centrifugação e após a descongelação nos grupos EJ-0h, EP-0h e EP-
24h.....35

Figura 14 - Taxas de concepção (%) obtidas nos grupos EJ-0h, EP-0h e EP-
24h.....36

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Anatomofisiologia do epidídimo.....	4
2.2. Plasma seminal.....	4
2.3. Colheita de espermatozóides da cauda do epidídimo.....	5
2.3.1. Técnicas de colheita de espermatozóides do epidídimo.....	6
2.3.1.1. Métodos utilizados em pacientes vivos.....	6
2.3.1.2. Métodos utilizados em animais mortos.....	6
<i>Método de flutuação.....</i>	<i>6</i>
<i>Método de perfuração.....</i>	<i>7</i>
<i>Fluxo retrógrado da cauda do epidídimo.....</i>	<i>7</i>
2.4. Viabilidade espermática em função do tempo de armazenamento do epidídimo.....	9
2.5. Fertilidade de espermatozóides da cauda do epidídimo	10
3. OBJETIVOS.....	15
3.1. Experimento I.....	15
3.2. Experimento II.....	15
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1. Experimento I.....	16
4.1.1. Animais e local da pesquisa.....	16
4.1.2. Metodologia.....	16
4.1.2.1. Orquiectomia Bilateral.....	16

4.1.2.2. Armazenamento do epidídimo.....	17
4.1.2.3. Colheita dos espermatozóides da cauda do epidídimo.....	18
4.1.2.4. Congelação dos espermatozóides do epidídimo.....	20
4.1.2.5. Análise das amostras.....	20
4.2. Experimento II.....	21
4.2.1. Animais e local da pesquisa.....	21
4.2.2. Metodologia.....	21
4.2.2.1. Colheita de sêmen com vagina artificial.....	21
4.2.2.2. Congelação das amostras seminais colhidas com vagina artificial.....	23
4.2.2.3. Colheita dos espermatozóides da cauda do epidídimo.....	23
4.2.2.4. Análise das amostras.....	24
4.2.2.5. Teste de fertilidade.....	24
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	26
6. RESULTADOS.....	27
6.1. Experimento I.....	27
6.2. Experimento II.....	33
7. DISCUSSÃO.....	37
7.1. Experimento I.....	38
7.2. Experimento II.....	40
8. CONCLUSÕES.....	44
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
10. TRABALHO CIENTÍFICO.....	58
ANEXOS.....	63

MONTEIRO, G. A. **Criopreservação e fertilidade de espermatozóides recuperados da cauda do epidídimo de garanhões.** Botucatu. 2010 Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

A recuperação de espermatozóides da cauda do epidídimo e sua criopreservação pode ser a última chance para recuperação do material genético quando ocorre morte súbita ou lesão grave em garanhões de alto valor genético. Sendo assim, o objetivo do experimento I foi comparar os parâmetros espermáticos dos espermatozóides da cauda do epidídimo recuperados imediatamente após orquiectomia e em diferentes momentos após armazenamento a 5°C e a temperatura ambiente. Já o experimento II, teve o objetivo de comparar os parâmetros espermáticos e fertilidade dos espermatozóides do ejaculado e do epidídimo recuperados logo depois da orquiectomia e após armazenamento por 24 horas a 5°C. No experimento I, 48 garanhões foram submetidos à orquiectomia bilateral, sendo que em oito a colheita dos espermatozóides do epidídimo foi realizada imediatamente após orquiectomia (grupo controle). Nos outros 40 garanhões, um epidídimo foi armazenado a temperatura ambiente e o contralateral armazenado a 5°C por 6, 12, 18, 24 e 30 horas, de acordo com o grupo. No experimento II, dois ejaculados de oito garanhões foram colhidos com vagina artificial e congelados (grupo EJ-0h). Uma semana após, os garanhões foram submetidos à orquiectomia bilateral, sendo que os espermatozóides de um epidídimo foram congelados imediatamente após orquiectomia (grupo EP-0h) e o epidídimo contralateral foi previamente armazenado por 24 horas a 5°C (EP-24h). O teste de fertilidade demonstrou que o grupo EP-0h (92,3%; n=13) tendem a ser maior que os grupos EJ-0h (61,5%; n=13) e EP-24h (61,5%; n=13). Conclui-se que o armazenamento dos testículos-epidídimos a 5°C proporcionou melhor preservação espermática e que, independente da temperatura, a motilidade progressiva é o parâmetro espermático mais sensível ao tempo de armazenamento.

Palavras-chave: Criopreservação espermática; Cauda do Epidídimo; Espermatozóides; Fertilidade; Armazenamento; Equino.

MONTEIRO, G. A. **Criopreservation and fertility of stallion sperm epididymal cauda**. Botucatu. 2010 Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Cauda epididymis sperm recovery and cryopreservation may be the last chance to obtain genetical material when sudden death or serious injury occur in valuable stallions. Thus, the aim of experiment I was to compare sperm parameters of epididymal sperm recovered immediately after orchiectomy and at different moments after storage at 5°C and at room temperature. Experiment II aimed to compare sperm parameters and fertility of ejaculated sperm and epididymal sperm recovered immediately after orchiectomy and after storage for 24h at 5°C. In experiment I, 48 stallions were submitted to bilateral orchiectomy, in eight of those the sperm collection were done immediately after orchiectomy (control group). In the other 40 stallions, one epididymis was stored at room temperature and the other was stored at 5°C for 6, 12, 18, 24 and 30 hours accorded to groups. In experiment II, two ejaculated from eight stallions were obtained with artificial vagina and cryopreserved (group EJ-0h). One week later, the stallions were submitted to bilateral orchiectomy, and the sperm of one epididymal were frozen immediately after orchiectomy (group EP-0h) and the contralateral epididymal was previously storage for 24h at 5°C (EP-24h). Fertility test showed that group EP-0h (92,3%; n=13) tended to be higher than groups EJ-0h (61,5%; n=13) and EP-24h (61,5%; n=13). These results allowed concluding that storage of the testis-epididymis complex at 5°C is more efficient in preserving sperm parameters than room temperature storage and that progressive motility is the parameter that is more affected by storage period, regardless of the temperature.

Keywords: Sperm cryopreservation; Cauda epididymis; Sperm; Fertility; Storage; Equine.

1. INTRODUÇÃO

A morte inesperada, processos obstrutivos ou distúrbios traumáticos podem interromper prematuramente a vida reprodutiva de garanhões de alto valor genético. Nesses casos, novas formas de colheita de sêmen têm sido estudadas com objetivo de preservar a genética valiosa destes animais.

A primeira prenhez obtida com a utilização de espermatozóides congelados na espécie equina foi relatada a partir de espermatozóides recuperados da cauda do epidídimo (BARKER e GANDIER, 1957). Apesar da fertilidade desses espermatozóides ter sido comprovada há mais de cinco décadas, por muitos anos os estudos limitaram-se a pesquisar a preservação de espermatozóides provenientes do ejaculado.

Somente nos últimos anos alguns pesquisadores intensificaram o estudo da recuperação e preservação de espermatozóides viáveis à partir da cauda do epidídimo (TIPLADY et al., 2002; JAMES et al., 2002; MORRIS, 2002; HERRERA et al., 2006; PAPA et al., 2008; MONTEIRO et al., 2009a; 2009b). Isto ocorreu devido ao crescente interesse pela preservação de espécies ameaçadas de extinção e preservação de células espermáticas de animais de produção de alto valor genético, impossibilitados de realizar cobertura ou colheita de sêmen com vagina artificial.

Tais estudos concentram-se no desenvolvimento e aprimoramento de técnicas de colheita de espermatozóides da cauda do epidídimo (CARY et al., 2004; BRUEMMER, 2006), comparação de meios diluentes (MELO et al., 2008; PAPA et al., 2008; GUASTI et al., 2009), refrigeração espermática (MONTEIRO et al., 2009a), efeito da adição de plasma seminal (MORRIS et al., 2002; TIPLADY et al., 2002; MOORE et al., 2005; PASQUINI, et al., 2008; HEISE et al., 2010), viabilidade espermática de

garanhões sub-férteis (MONTEIRO et al., 2009b), fertilidade (MELO et al., 2008; PAPA et al., 2008; HEISE et al., 2010), métodos de inseminação artificial (MORRIS, 2002) e injeção intracitoplasmática de espermatozóide (HERRERA et al., 2006).

Além disso, pesquisas têm sido desenvolvidas com o armazenamento do testículo-epidídimo (BRUEMMER et al., 2002; JAMES et al., 2002). Tais estudos têm o objetivo de adequar um protocolo que possibilite a retirada do testículo-epidídimo e seu posterior acondicionamento em sistemas de transporte para seu envio a laboratórios especializados para processamento e criopreservação dos espermatozóides.

Após a morte do animal, os espermatozóides permanecem viáveis no epidídimo até que a decomposição tecidual afete sua viabilidade (BRUEMMER et al., 2002; MURADÁS et al., 2006). Se os epidídimos forem armazenados a 5°C, a viabilidade espermática pode ser mantida um maior período de tempo (BRUEMMER et al., 2002; JAMES et al., 2002). Entretanto, não é possível prever a capacidade fecundante destas células, visto que nenhum estudo comparou sua fertilidade com a dos espermatozóides obtidos a partir do ejaculado e os recuperados do epidídimo submetidos a acondicionamento.

O sucesso recentemente alcançado com os índices de fertilidade dos espermatozóides recuperados do epidídimo em equinos mostra a importância da realização de estudos que testem protocolos de acondicionamento e criopreservação destas células. Tais estudos tornam-se ainda mais relevantes quando se considera que a colheita de espermatozóides da cauda do epidídimo pode, em alguns casos, ser a última chance de preservação espermática.

O presente estudo teve como objetivo comparar a viabilidade dos espermatozóides recuperados da cauda do epidídimo imediatamente após a orquiectomia, com a viabilidade dos espermatozóides armazenados a 5°C e a temperatura ambiente por 6, 12,

18, 24 e 30 horas (Experimento I). Já no experimento II, objetivou-se comparar os parâmetros espermáticos e de fertilidade dos espermatozóides obtidos do ejaculado com os parâmetros dos espermatozóides recuperados da cauda do epidídimo imediatamente após orquiectomia e após o armazenamento por 24 horas a 5°C.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ANATOMOFISIOLOGIA DO EPIDÍDIMO

À medida que passam pelo epidídimo, os espermatozóides sofrem importantes alterações morfofuncionais (BARTH e OKO, 1989). O epidídimo é um órgão alongado, enovelado, localizado na superfície do testículo (SULLIVAN et al., 2005). Ele pode ser dividido anatomicamente em três segmentos: cabeça, onde há absorção de fluidos (MARENGO, 2008); corpo, onde os espermatozóides passam a apresentar capacidade fecundante, e cauda, cuja função básica é o armazenamento e a manutenção de espermatozóides maduros (SHIVAJI, 1988).

Os efeitos fisiológicos da aquisição de macromoléculas no epidídimo não foram completamente elucidados, mas sabe-se que esta é uma etapa necessária para o desenvolvimento da motilidade e capacidade fecundante dos espermatozóides (JONES, 1998). Esta hipótese é sustentada por estudos que apresentaram melhores taxas de fertilização utilizando espermatozóides colhidos da cauda do epidídimo, quando comparado a amostras colhidas da cabeça e do corpo epididimário (YOUNG, 1931; ORGEBIM-CRIST, 1969; HOLTZ e SMIDT, 1976). Após a maturação, os espermatozóides são armazenados na cauda do epidídimo e, ao saírem da mesma, entram em contato com as secreções das glândulas anexas que, por sua vez, estimulam a motilidade inicial dos espermatozóides (MAXWELL e JOHNSON, 2000).

2.2 PLASMA SEMINAL

O plasma seminal é um fluido produzido pela rede testis, epidídimo e glândulas sexuais acessórias. Este fluido é expelido durante a ejaculação e sua composição

apresenta diferentes componentes bioquímicos de acordo com a fração expelida (AMANN e GRAHAM, 1993).

Durante o processo de ejaculação, os espermatozóides sofrem várias transformações na membrana devido ao contato com a secreção proveniente das glândulas acessórias (BOUÉ et al., 1996). A composição iônica do plasma seminal varia nas diferentes espécies, sendo íons como o cálcio, magnésio, zinco (BARRIER-BATTUT et al., 2002) e selênio (KENDALL et al., 2000) associados a alterações da função espermática.

Muitos estudos tem questionado a necessidade do plasma seminal no processo de fecundação, visto que espermatozóides da cauda do epidídimo que não tiveram contato com estas secreções foram capazes de fertilizar (BLASH et al., 2000; YU e LEIBO, 2002; MARTINS et al., 2009; PAPA et al., 2008).

2.3 COLHEITA DE ESPERMATOZÓIDES DA CAUDA DO EPIDÍDIMO

A colheita de espermatozóides viáveis do epidídimo tem sido relatada em inúmeras espécies, como bovinos (MARTINS et al., 2009), cervídeos (MARTINEZ-PASTOR et al., 2005a; MARTINEZ-PASTOR et al., 2006; FERNANDES-SANTOS et al., 2009), caprinos (MARTINEZ-PASTOR et al., 2005b), suínos (KIKUCHI et al., 1998), felinos (GAÑÁN et al., 2009) e equinos (PAPA et al., 2008; HEISE et al., 2010). Estudos recentes demonstram que o número total de espermatozóides recuperados da cauda do epidídimo de garanhões é superior ao encontrado em ejaculados (GRANEMANN, 2006; MURADÁS et al., 2006; MONTEIRO et al., 2009b). Além disso, estas células apresentam motilidade progressiva igual ou superior aos espermatozóides do ejaculado (TIPLADY et al., 2002).

2.3.1 Técnicas de colheita de espermatozóides do epidídimo

O objetivo geral da obtenção de espermatozóides viáveis do epidídimo é a sua utilização em técnicas de reprodução assistida, como inseminação artificial (PAPA et al., 2008; HEISE et al., 2010) e injeção intracitoplasmática de espermatozóides (HERRERA et al., 2006).

Existem cinco métodos básicos para recuperação de espermatozóides do epidídimo. Usualmente, duas técnicas são aplicadas a pacientes vivos e três são utilizadas para colheita em animais mortos (GUERRERO, 2006).

2.3.1.1 Métodos utilizados em pacientes vivos

A aspiração microcirúrgica de espermatozóides do epidídimo (MESA) (TEMPLE-SMITH et al., 1985; SILBER et al., 1994) e a aspiração percutânea de espermatozóides do epidídimo (PESA) (SHRIVASTAV et al., 1994) são, normalmente, aplicadas em humanos e representam um grande avanço biotecnológico no combate à infertilidade masculina.

2.3.1.2 Métodos utilizados em animais mortos

Método de Flutuação

O método de flutuação consiste em cortar ou fatiar a cauda do epidídimo (Figura 1a e 1b). Várias incisões longitudinais são realizadas para expor os espermatozóides ao meio exterior. Logo após, a cauda do epidídimo é mantida em um meio gelatinoso, possibilitando a migração dos espermatozóides para o meio (Figura 1c) e sua posterior recuperação através de filtração (YU e LEIBO, 2002). Apesar de ser frequentemente aplicada a espécies de pequeno porte devido ao tamanho de seus epidídimos, esta

técnica também pode ser utilizada na recuperação de espermatozóides do epidídimo de espécies de grande porte (HISHINUMA et al., 2003; GUERRERO, 2006).

FIGURA 1 – Etapas que antecedem a recuperação de espermatozóides pela técnica de flutuação consistem: separação da cauda do epidídimo e remoção do tecido conjuntivo que recobre a cauda do epidídimo (a); incisões para proporcionar a migração dos espermatozóides do lúmen da cauda do epidídimo (b) e repouso para migração dos espermatozóides para o meio diluente (c) (MONTEIRO et al., 2009c).

Método de Perfuração

Na técnica de perfuração, a cauda do epidídimo é colocada em uma placa de petri e o ducto epididimário é perfurado com auxílio de uma agulha (BARTELS et al., 2000) Posteriormente, as amostras são filtradas e centrifugadas para diminuir a presença de detritos celulares. Esta técnica proporciona uma elevada taxa de recuperação de espermatozóides, entretanto, a viabilidade espermática pode ser afetada devido à exposição à centrifugação e componentes sanguíneos (GUERRERO, 2006).

Fluxo retrógrado da Cauda do Epidídimo

A técnica de fluxo retrógrado na cauda do epidídimo consiste na geração de pressão com o uso de uma seringa nos vasos deferentes até que os espermatozóides epididimários sejam carreados pelo diluente e extravasem pelo corte realizado na junção entre a cauda e o corpo do epidídimo (GARDE et al., 1994). A recuperação espermática média com esse método varia de 15 a 20 bilhões de espermatozóides por epidídimo (BRUEMMER, 2006).

A técnica de fluxo retrógrado modificada, relatada por Granemann (2006), consiste na separação do complexo testículo-epidídimo (Figura 2a) seguida pela remoção dos tecidos que envolvem o epidídimo a partir da dissecação do tecido conjuntivo que recobre a cauda do epidídimo (Figura 2b). Após desfazer os contornos do ducto epididimário (Figura 2c), este deve ser seccionado em três partes para facilitar a lavagem.

FIGURA 2 – Etapas que antecedem a recuperação de espermatozoides pela técnica de fluxo retrógrado consistem: separar o complexo testículo-epidídimo (**a**); remover o tecido conjuntivo que recobre a cauda do epidídimo (**b**) e desfazer os contornos da cauda do epidídimo (**c**) (MONTEIRO et al., 2009c).

Para extrair os espermatozoides do epidídimo, o segmento deve ser estendido na posição vertical (Figura 3a, 3b e 3c) e o diluente injetado no lúmen até que os espermatozoides sejam carregados pelo diluente e recuperados na outra extremidade. Com esta técnica, o número de espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo foi superior àquele obtido do ejaculado (GRANEMANN, 2006).

FIGURA 3 – recuperação de sêmen do epidídimo pela técnica de fluxo retrógrado: após a secção do ducto da cauda do epidídimo em três partes ele é estendido na posição vertical e o diluente injetado no lúmen até a outra extremidade (**a, b, c**) (MONTEIRO et al., 2009c).

2.4 VIABILIDADE ESPERMÁTICA EM FUNÇÃO DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO DO EPIDÍDIMO

A colheita de espermatozóides da cauda do epidídimo em garanhões mostrou-se eficiente para recuperar células espermáticas viáveis (TIPLADY et al., 2002; JAMES et al., 2002; BRUEMMER, 2006; MELO et al., 2008; PAPA et al., 2008; MONTEIRO., 2009a, 2009b). No entanto, a falta de conhecimento técnico específico sobre o armazenamento e transporte do epidídimo, muitas vezes inviabiliza a preservação espermática em decorrência da degeneração tecidual pós-morte (JAMES et al., 2002).

Pesquisas têm avaliado a viabilidade espermática em função do tempo de armazenamento do epidídimo possibilitando, assim, a definição das melhores formas de acondicionamento e transporte do material até um centro de reprodução capacitado para a recuperação e criopreservação destas células (JAMES et al., 2002, GRANEMANN, 2006; MURADÁS, 2006).

Estudos realizados em caprinos demonstraram que os espermatozóides provenientes de epidídimos armazenados a 5°C por até 72 horas apresentaram parâmetros espermáticos satisfatórios, podendo ser utilizados em biotecnologias da reprodução (MARTINEZ-PASTOR et al., 2005b).

Em cervídeos, Martinez-Pastor et al, (2005a) avaliaram os parâmetros espermáticos em função do tempo pós-morte, observando valores satisfatórios até 48 horas. Os autores constataram, ainda, que o parâmetro espermático mais afetado durante o armazenamento foi a motilidade espermática.

James et al. (2002) avaliaram a viabilidade espermática após o armazenamento do epidídimo de eqüinos a 5°C por até 96 horas. Neste estudo, não houve diferença no percentual de motilidade progressiva e na integridade de membrana avaliados após a descongelação. Adicionalmente, estudos realizados com felinos, caninos, caprinos,

suínos e bovinos demonstraram que a maioria destas espécies possui melhor viabilidade seminal quando os testículos são armazenados entre 4 e 5°C, comparados com os mantidos à temperatura ambiente (JAMES, 2004).

À temperatura ambiente, observou-se em garanhões um declínio da qualidade espermática com o aumento do tempo, tendo como limite de viabilidade próximo das 24 horas pós-orquiectomia. Este decréscimo pode ser explicado pelo envelhecimento e esgotamento metabólico dos espermatozóides, assim como, pelo processo de degeneração tecidual pós-morte. Temperaturas mais baixas retardam o processo de degeneração e diminuem o metabolismo dos espermatozóides mantendo-os viáveis por mais tempo (GRANEMANN, 2006).

Outros estudos avaliaram a viabilidade espermática após o armazenamento do epidídimo a 5°C por 24 horas. Estes estudos realizados em cervídeos (ZOMBORSKY et al., 1999), caninos (MARKS et al., 1994) e equinos (BRUEMMER et al., 2002; PAPA et al., 2008) demonstraram que os espermatozóides recuperados foram processados e congelados com sucesso. No entanto, poucos estudos compararam a fertilidade destes espermatozóides com a dos espermatozóides do ejaculado.

2.5 FERTILIDADE DE ESPERMATOZÓIDES DA CAUDA DO EPIDÍDIMO

A primeira prenhez utilizando espermatozóides congelados na espécie equina foi relatada com espermatozóides recuperados da cauda do epidídimo (BARKER e GANDIER, 1957). Neste estudo, foram inseminadas oito éguas e a taxa de concepção foi de 12,5% (1/8).

Estudos recentes em equinos demonstram que os espermatozóides obtidos no epidídimo podem ser usados em inseminações artificiais (MORRIS et al., 2002; PAPA et al., 2008; MELO et al., 2008) com sêmen fresco ou congelado resultando em prenhez (MORRIS et al., 2002; PAPA et al., 2008; HEISE et al., 2010). No entanto, a taxa de

concepção destes espermatozóides foi considerada, por muitos anos, inferior ao dos espermatozóides do ejaculado (TIPLADY et al., 2002).

Monteiro et al, (2009a) avaliaram a resistência dos espermatozóides provenientes do ejaculado com a dos espermatozóides do epidídimo submetidos ao processo de refrigeração por 24 e 48 horas. Para isto, as amostras espermáticas após a colheita foram acondicionadas a 5°C em caixas de refrigeração Botutainer®¹. Os parâmetros (motilidade total, motilidade progressiva e integridade de membrana) dos espermatozóides do epidídimo, tanto com 24 quanto com 48 horas de refrigeração, foram significativamente superiores ($p<0,05$) aos parâmetros dos espermatozóides colhidos com vagina artificial, demonstrando que estes espermatozóides são mais resistentes ao processo de refrigeração.

Algumas pesquisas têm avaliado a viabilidade dos espermatozóides do epidídimo após a congelação. A utilização destes espermatozóides congelados necessita de cuidados com o momento e os métodos de inseminação artificial (PAPA et al., 2008). Métodos de inseminação na extremidade do corno uterino e por histeroscopia permitem diminuir número de espermatozóides por dose inseminante, além de melhorar a taxa de concepção, devendo ser utilizados em inseminações com espermatozóides congelados (MORRIS, 2004) e com espermatozóides recuperados da cauda do epidídimo (MORRIS et al., 2002). A utilização destes métodos proporciona um melhor aproveitamento das doses estocadas.

Morris et al. (2002) obtiveram taxa de concepção de 45% em éguas inseminadas com 200×10^6 de espermatozóides do epidídimo, a fresco. Utilizando esta mesma dose inseminante com espermatozóides congelados, foram obtidos 18 e 8% de taxa de concepção quando as éguas foram inseminadas por histeroscopia e método

¹ Biotech Ltda, Botucatu , Brasil.

convencional, respectivamente. Os pesquisadores concluíram que é possível obter produtos utilizando espermatozóides do epidídimo em doses inseminantes de baixo número de espermatozóides, e que a fertilidade cai acentuadamente após o processo de congelamento.

Papa et al. (2008) avaliaram a fertilidade de espermatozóides criopreservados recuperados da cauda do epidídimo de garanhões com a utilização do diluente de congelamento Botu-Crio^{®2}, obtendo taxa de concepção de 66,6% em éguas inseminadas no ápice do corno, com 400×10^6 espermatozóides viáveis pré e pós-congelamento. Esta taxa de concepção nunca foi descrita com espermatozóides congelados do epidídimo, sendo equivalente a taxas de concepção obtidas com o uso de espermatozóides congelados do ejaculado (MARTIN et al., 1979; JASKO et al, 1992; NEVES NETO, 2004).

Pasquini et al. (2008), compararam a eficiência de fatores estimuladores de motilidade espermática na congelamento de espermatozóides do epidídimo de garanhões. Este estudo concluiu que a utilização dos meios Fert-Talp, Talp + Progesterona e Sperm-Talp, comumente utilizados em protocolos de fertilização *in vitro*, melhorou a motilidade de espermatozóides do epidídimo após descongelamento.

Morris et al. (2002) avaliaram o efeito da exposição ao Sperm-Talp sobre a fertilidade de espermatozóides provenientes do epidídimo de garanhões. As taxas de concepção destes espermatozóides foram avaliadas com e sem o contato prévio das células com o meio Sperm-Talp. As inseminações foram realizadas por histeroscopia, utilizando doses descongeladas de 0,5 mL cada, contendo 5×10^6 espermatozóides móveis. Desta forma, foram obtidas taxas de concepção de 0 e 29% nos grupos sem e com exposição prévia ao Sperm-Talp, respectivamente.

² Biotech Ltda, Botucatu , Brasil.

Heise et al. (2010) compararam a taxa de concepção de espermatozóides recuperados da cauda epidídimo e acrescidos ou não de plasma seminal (PS). A dose inseminante utilizada foi de 200×10^6 espermatozóides apresentando motilidade progressiva. Com isto, os pesquisadores encontraram taxas de concepção de 55.6% com o uso de espermatozóides do ejaculado a fresco, e de 38.9% com o uso de congelados. Já com o uso de espermatozóides provenientes do epidídimo, as taxas de fertilidade obtidas na presença do plasma seminal foram de 75.0% para sêmen fresco e de 27.8% para sêmen congelado. Na ausência do plasma seminal, estes valores foram de 22.2% e 6.7% com o uso de sêmen fresco e congelado, respectivamente. Este estudo demonstrou a maior capacidade fecundante dos espermatozóides obtidos do epidídimo de garanhões após adição de plasma seminal.

Monteiro et al. (2009b) demonstraram que o contato do ejaculado de garanhões sub-férteis com o plasma seminal pode ter efeito deletério sobre a qualidade espermática. Neste estudo, a motilidade total, a motilidade progressiva e a integridade da membrana plasmática dos espermatozóides obtidos da cauda do epidídimo sem contato com plasma seminal, foram superiores aos obtidos nas células provenientes do ejaculado, tanto pré quanto pós congelação. No teste de fertilidade, os espermatozóides do epidídimo após a descongelação apresentaram taxa de concepção de 25% com inseminações na extremidade do corno uterino utilizando 400×10^6 de espermatozóides viáveis por dose inseminante.

Os espermatozóides do epidídimo também podem ser utilizados em técnicas como a ICSI, sem apresentar diferença na proporção de clivagem embrionária quando comparados àquela apresentada por espermatozóides criopreservados do ejaculado de garanhões (HERRERA et al., 2006).

Em eqüinos, espermatozóides da cauda do epidídimo demonstraram ser resistentes ao processo de criopreservação possibilitando, assim, a obtenção de produtos de garanhões descartados da reprodução ou mesmo após sua morte, a partir de inseminações artificiais convencionais (BARKER e GANDIER, 1957; MORRIS et al., 2002; MELO et al., 2008; PAPA et al., 2008), inseminações histeroscópicas (MORRIS et al., 2002) e injeção intracitoplasmática de espermatozóide (HERRERA et al., 2006).

3. OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a viabilidade dos espermatozóides criopreservados recuperados da cauda do epidídimo a partir da técnica de fluxo retrógrado.

Desta forma, os objetivos específicos relacionados a este trabalho foram:

3.1. Experimento I

Comparar os parâmetros espermáticos dos espermatozóides recuperados da cauda do epidídimo imediatamente após orquiectomia, com os dos grupos em que os epidídimos foram armazenados a 5°C e a temperatura ambiente por 6, 12, 18, 24 e 30 horas antes da recuperação espermática.

3.2. Experimento II

Comparar os parâmetros espermáticos e índices de fertilidade dos espermatozóides do ejaculado, da cauda do epidídimo imediatamente após orquiectomia e da cauda do epidídimo após armazenamento por 24 horas a 5°C.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 EXPERIMENTO I – Avaliação da viabilidade dos espermatozóides recuperados da cauda do epidídimo e armazenados a temperatura ambiente e a 5°C por um período até 30 horas.

4.1.1 Animais e Local da Pesquisa

Foram utilizados 48 garanhões entre quatro e seis anos de idade, sendo 34 da raça Brasileiro de Hipismo, 2 Puro Sangue Lusitano, 8 Quarto de milha e 4 Mangalarga Machador. Os animais são provenientes de propriedades localizadas no município de Arandu-SP e do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da FMVZ – UNESP - Botucatu.

4.1.2 Metodologia

A metodologia utilizada no experimento I encontra-se descrita na Figura 4.

4.1.2.1 Orquiectomia Bilateral

Durante o período pré-operatório os animais foram submetidos a jejum alimentar de 14 horas. O procedimento cirúrgico foi realizado com os garanhões em estação, utilizando 0,5 mg/Kg/i.v de cloridrato de xilazina 10%³, associado a 0,05 mg/Kg/i.v de cloridrato de acepromazina⁴ para a sedação dos mesmos. Após 15 minutos da administração dos sedativos, foi realizada a anti-sepsia da região escrotal com polivinilpirrolidona-iodo.

³ Sedazine – Fort Dodge Inc. SP, Brasil.

⁴ Acepran - Univet S/A - Indústria Veterinária. SP, Brasil.

Após anestesia local intratesticular, realizada com 10 mL de cloridrato de lidocaína 2% com vasoconstritor, foram realizadas duas incisões de aproximadamente 8 centímetros paralelas à rafe mediana escrotal. Os testículos foram expostos pela incisão da túnica dartos e da túnica vaginal parietal, tracionados e em seguida efetuou-se a incisão e hemostasia do funículo com o auxílio de um emasculador.

Imediatamente após a orquiectomia, o complexo testículo-epidídimo foi armazenado em um saco plástico identificado, contendo 80 mL de Ringer com lactado de sódio. Para evitar o extravasamento de sangue e espermatozóides durante o transporte, o funículo espermático foi ligado com fios de seda.

4.1.2.2 Armazenamento do epidídimo

No grupo 1 (Controle) foram utilizados oito garanhões, sendo a colheita dos espermatozóides, realizada imediatamente após a orquiectomia (0 hora). Neste grupo, foi incluído apenas um epidídimo de cada garanhão (totalizando quatro epidídimos direitos e quatro epidídimos esquerdos), seguindo o mesmo número de epidídimos utilizado nos grupos subsequentes.

Os outros 40 garanhões (80 epidídimos) foram divididos em 5 grupos, sendo um epidídimo armazenado a temperatura ambiente e o epidídimo contralateral armazenado a 5°C pelo mesmo período de tempo, totalizando, quatro epidídimos direitos e quatro epidídimos esquerdos por grupo (n=8).

Após a orquiectomia e antes da colheita dos espermatozóides, os epidídimos foram armazenados a 5°C por 6, 12, 18, 24 e 30 horas nos grupos 5°C-06h, 5°C-12h, 5°C-18h, 5°C-24h e 5°C-30h, respectivamente. Os epidídimos contralaterais foram armazenados a temperatura ambiente (18 a 24°C), sendo a colheita dos espermatozóides

realizada 6, 12, 18, 24 e 30 horas após a orquiectomia nos grupos TA-6h, TA-12h, TA-18h, TA-24h e TA-30h, respectivamente (Figura 4).

O acondicionamento dos epidídimos a 5°C foi realizado em caixas de refrigeração Botutainer⁵, com taxa de refrigeração de 0,05°C por minuto até a estabilização a 5°C. Os epidídimos armazenados a temperatura ambiente permaneceram em um laboratório climatizado, com temperatura controlada entre 18°C e 24°C.

4.1.2.3 Colheita dos espermatozóides da cauda do epidídimo

A colheita dos espermatozóides da cauda do epidídimo foi realizada pela da técnica de fluxo retrógrado relatada por Garde et al. (1994) e Bruemmer et al. (2002) em todos os grupos. O tecido conjuntivo que recobre o epidídimo foi removido e os contornos do ducto epididimário da cauda do epidídimo desfeitos. Em seguida, o ducto epididimário foi lavado injetando-se 30 mL de diluente (Botu-sêmen^{®6}, pré-aquecido a 37°C) no lúmen, fazendo com que os espermatozóides fossem carreados pelo diluente.

A avaliação da concentração espermática (mm^3) foi determinada por meio de câmara hematocitométrica, sob microscopia com contraste de fase⁷ em aumento de 100 a 400 vezes. Para isso, utilizou-se uma alíquota da amostra diluída na proporção de 10 μL da amostra para 990 μL de água destilada (1:100). O número total de espermatozóides recuperados de cada epidídimo foi obtido pela multiplicação da concentração espermática (mm^3) pelo volume total da amostra.

⁵ Biotech Ltda, Botucatu , Brasil.

⁶ Biotech Ltda, Botucatu , Brasil.

⁷ Micronal S.A., São Paulo

FIGURA 4 – Esquema da metodologia utilizada no experimento I.

4.1.2.4 Congelação dos espermatozóides do epidídimo

Após a recuperação dos espermatozóides do epidídimo e a avaliação da concentração espermática, uma amostra foi centrifugada a 600xg por 10 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi desprezado e o “pellet” foi ressuscitado com o diluente Botu-Crio^{®8} na concentração de 200 milhões de espermatozóides móveis/mL.

Após o envase em palhetas de 0,5 mL, as mesmas foram levadas à geladeira de temperatura controlada (Minitub^{®9}) e permaneceram a 5°C por 20 minutos. Posteriormente, foram acondicionadas em caixa isotérmica com capacidade de 45 litros, preenchida com nitrogênio líquido até a marca de 3,5 cm de altura. As palhetas ficaram dispostas horizontalmente a 6,0 cm do nível do nitrogênio líquido por 20 minutos e, após este período, foram imersas no mesmo (PAPA et al., 2002).

4.1.2.5 Análise das amostras

As análises laboratoriais, processamento, congelação e estocagem das amostras seminais foram conduzidas no CERAN (Centro de Biotecnologia e Diagnóstico em Reprodução Animal), pertencente ao Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Campus de Botucatu/SP.

Os espermatozóides colhidos da cauda do epidídimo foram avaliados pelo método computadorizado CASA (HTM-IVOS 12¹⁰) imediatamente após recuperação, após ressuspensão com diluente de congelação e após descongelação a 46°C por 20 segundos. Os parâmetros avaliados: motilidade total (MT; %), motilidade progressiva (PM; %), velocidade linear progressiva (VSL; $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL;

⁸ Biotech LTDA, Botucatu, Brasil.

⁹ Minitub do Brasil LTDA.

¹⁰ Hamilton Thorne Research, USA.

$\mu\text{m/s}$) e espermatozóides rápidos (RAP; %). Além disso, uma alíquota foi destinada à análise de integridade da membrana plasmática (IMP; %) por microscopia de epi-fluorescência¹¹ (ZÚCCARI, 1998).

4.2 EXPERIMENTO II – Comparação dos parâmetros espermáticos e índices de fertilidade dos espermatozóides do ejaculado, da cauda do epidídimo imediatamente após orquiectomia e da cauda do epidídimo após armazenamento por 24 horas a 5°C.

4.2.1 Animais e Local da Pesquisa

Foram utilizados oito garanhões clinicamente sadios e previamente submetidos a exame andrológico (quatro a seis anos de idade), sendo quatro Brasileiros de Hipismo, dois Puro Sangue Lusitano e dois Mangalarga Machador. Para o teste de fertilidade foram utilizadas 13 éguas com idade entre 4 e 15 anos, pertencentes ao Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da FMVZ/UNESP - Botucatu.

4.2.2 Metodologia

A metodologia utilizada no experimento II encontra-se descrita na Figura 5.

4.2.2.1 Colheita de sêmen com vagina artificial

Foram colhidos dois ejaculados de cada garanhão (EJ-0h) com intervalo de uma semana entre as colheitas. Os ejaculados foram obtidos com auxílio de uma vagina artificial modelo Botucatu¹², constituída por um tubo rígido, mucosa de látex, mucosa plástica e copo coletor revestido de camisa sanitária descartável.

¹¹ Leica Microsystems – DMLB- Alemanha.

¹² Biotech Ltda, Botucatu , Brasil.

FIGURA 5 – Esquema da metodologia utilizada no experimento II.

4.2.2.2 Congelação das amostras seminais colhidas com vagina artificial

Imediatamente após a colheita, os ejaculados foram diluídos na proporção 1:1 com o diluente Botu-Sêmen^{®13}, e centrifugados a 600xg por 10 minutos. Posteriormente o sobrenadante foi desprezado e o “pellet” ressuspendido com o diluente Botu-Crio^{®14} na concentração de 200 milhões de espermatozóides viáveis por mL.

Após o envase em palhetas de 0,5 mL, as mesmas foram colocadas em geladeira Minitub^{®15} e permaneceram a temperatura de 5°C por 20 minutos. Posteriormente, foram acondicionadas em caixa isotérmica com capacidade de 45 litros, preenchida com nitrogênio líquido até a marca de 3,5 cm de altura. As palhetas foram dispostas horizontalmente a 6,0 cm acima do nível do nitrogênio líquido por 20 minutos e após este período, foram imersas no mesmo (PAPA et al., 2002).

4.2.2.3 Colheita dos espermatozóides da cauda do epidídimo

Uma semana após a última colheita do sêmen com vagina artificial, os mesmos garanhões foram submetidos à orquiectomia bilateral conforme descrito no experimento I (item 4.1.2.1). Imediatamente após a orquiectomia, foi realizada a colheita dos espermatozóides da cauda do epidídimo de um testículo de cada garanhão, alternando entre direito e esquerdo, no grupo EP-0h. Os testículos contralaterais permaneceram acondicionados em caixa de refrigeração Botutainer^{®16} por um período de 24 horas, antes da recuperação dos espermatozóides epididimários no grupo EP-24h (Figura 5). A taxa de refrigeração dos epidídimos armazenados no sistema de transporte passivo (Botutainer) foi de 0,05°C/minuto até estabilização à 5°C.

¹³ Biotech Ltda, Botucatu , Brasil.

¹⁴ Biotech Ltda, Botucatu , Brasil.

¹⁵ Minitub do Brasil LTDA.

¹⁶ Biotech Ltda, Botucatu , Brasil.

A colheita do sêmen da cauda do epidídimo foi realizada pela técnica de fluxo retrógrado relatada por Garde et al. (1994) e Bruemmer et al. (2002). A congelamento espermática seguiu o mesmo protocolo descrito no experimento I (item 4.1.2.3).

4.2.2.4 Análise das amostras

Tanto os espermatozóides colhidos pelo uso de vagina artificial quanto os recuperados da cauda do epidídimo foram avaliados pelo método computadorizado – CASA (HTM-IVOS 12) – imediatamente após a sua obtenção e logo após a ressuspensão da amostra com diluente de congelamento, e ainda após sua descongelamento a 46°C por 20 segundos. Os seguintes parâmetros foram avaliados: motilidade total (MT; %), motilidade progressiva (PM; %), velocidade linear progressiva (VSL; $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL; $\mu\text{m/s}$) e espermatozóides rápidos (RAP; %). Uma alíquota foi destinada à análise de integridade de membrana plasmática (IMP; %) por microscopia de epi-fluorescência¹⁷ (ZÚCCARI, 1998). A morfologia espermática foi avaliada por meio de esfregaços corados pelo método de Karras modificado por PAPA et al (1988).

4.2.2.5 Teste de Fertilidade

Para a realização do teste de fertilidade foram utilizadas 13 éguas. Cada uma delas foi submetida à inseminação artificial por três ciclos, totalizando 39 ciclos. Cada égua foi inseminada com espermatozóides provenientes dos grupos: ejaculado (EJ-0h), recuperados do epidídimo imediatamente após orquiectomia (EP-0h) e recuperados do epidídimo após 24 horas de armazenamento a 5°C (EP-24h).

¹⁷ Leica Microsystems – DMLB-Alemanha

As éguas foram distribuídas aleatoriamente e utilizadas nos três grupos testados (EJ-0h, EP-0h, EP-24h). Estas foram monitoradas por exame ultra-sonográfico transretal e, depois da constatação de um folículo com 35 mm, a ovulação foi induzida com 1 mg de GnRH (deslorelina). Após 34 horas da administração do indutor de ovulação, as mesmas foram monitoradas por ultrassonografia até a detecção da ovulação. Neste momento, as fêmeas foram inseminadas com 800×10^6 espermatozóides móveis pré congelação, obtidos através de um “pool” formado por uma palheta de cada garanhão, que formaram um total de oito palhetas.

As oito palhetas foram descongeladas a 46°C por 20 segundos, acondicionadas dentro da pipeta flexível¹⁸ e, com auxílio de um mandril, os espermatozóides foram depositados na extremidade do corno ipsilateral à ovulação.

O diagnóstico de gestação foi realizado entre 12 e 15 dias após a ovulação, com o auxílio do ultra-som (Pie Medical Falcon 100 Vet)¹⁹.

¹⁸ Minitub do Brasil Ltda, Porto Alegre-RS, Brasil

¹⁹ Nutricel, Ltda.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística do experimento I, os resultados provenientes dos grupos Controle, 5°C-06h, 5°C-12h, 5°C-18h, 5°C-24h, 5°C-30h, TA-6h, TA-12h, TA-18h, TA-24h e TA-30h, foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de TUKEY.

Para análise estatística do experimento II, os parâmetros espermáticos dos espermatozóides provenientes do ejaculado, dos espermatozóides do epidídimo recuperados, imediatamente, após a orquiectomia ou espermatozóides recuperados do epidídimo após 24 horas de armazenamento a 5°C, foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de TUKEY. Para os resultados de fertilidade entre os grupos (EJ-0h), (EP-0h) e (EP-24h) foi empregado o Teste Exato de Fisher.

O nível de significância em todas as análises foi considerado significativo quando $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1 Experimento I

No experimento I, o número médio de espermatozóides recuperados da cauda do epidídimo pela técnica de fluxo retrogrado foi de $16,2 \pm 7,79 \times 10^9$ de espermatozóides/epidídimo.

A partir dos resultados obtidos no experimento I, foram calculadas as médias e desvios padrão dos parâmetros dos espermatozóides da cauda do epidídimo imediatamente após recuperação (tabela 1), após ressuspensão com o diluente de congelação (tabela 2) e pós-descongelação (tabela 3).

Tabela 1 – Valores médios e desvios padrão de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade linear progressiva (VSL), velocidade curvilínea (VCL), espermatozóides rápidos (RAP) e integridade de membrana plasmática (IMP) imediatamente após a recuperação espermática nos grupos: controle (0 hora), armazenados à 5°C (5°C-06h, 5°C-12h, 5°C-18h, 5°C-24h e 5°C-30h) e armazenados à temperatura ambiente (TA-6h, TA-12h, TA-18h, TA-24h e TA-30).

Grupos (n=8)	MT (%)	MP (%)	VSL (µm/s)	VCL (µm/s)	RAP (%)	IMP (%)
Controle	29,4±20,80 ^a	9,8±7,90 ^{ab}	68,2±8,83 ^{ab}	205,0±20,10 ^{ab}	20,1±17,31 ^{ab}	72,1±10,28 ^a
5°C-06h	44,±21,98 ^a	17,6±12,11 ^a	70,6±9,46 ^a	175,9±21,16 ^a	32,88±18,12 ^a	69,9±17,33 ^{ab}
5°C-12h	30,0±30,61 ^{ab}	10,1±12,41 ^{ab}	75,4±11,44 ^{ab}	181,0±34,78 ^a	21,88±28,70 ^{ab}	68,1±9,28 ^{ab}
5°C-18h	32,9±20,61 ^{ab}	11,7±10,48 ^{ab}	71,5±6,82 ^{ab}	171,1±18,30 ^a	22,5±18,10 ^{ab}	62,0±9,30 ^{ab}
5°C-24h	26,4±18,73 ^{ab}	8,6±10,50 ^{ab}	59,3±13,81 ^a	162,6±34,62 ^{abc}	7,1±8,66 ^b	66,0±10,66 ^{ab}
5°C-30h	36,5±26,95 ^a	13,0±10,58 ^{ab}	77,8±13,12 ^a	185,3±29,88 ^a	26,25±19,41 ^a	68,8±14,62 ^{ab}
TA-06h	32,88±26,95 ^{ab}	12,5±9,69 ^{ab}	64,4±6,95 ^{ab}	156,5±28,52 ^{abc}	22,9±18,54 ^{ab}	69,4±12,23 ^{ab}
TA-12h	1,1±1,25 ^b	0,25±0,46 ^b	31,6±27,98 ^b	86,8±72,97 ^{abc}	0,25±0,46 ^b	65,3±13,48 ^{ab}
TA-18h	0,6±1,06 ^b	0,25±0,46 ^b	18,4±25,64 ^b	39,5±54,52 ^{abc}	0,1±0,35 ^b	62,0±14,32 ^{ab}
TA-24h	1,7±3,11 ^b	0,25±0,71 ^b	38,8±36,02 ^b	90,8±81,00 ^{bc}	3,5±5,29 ^b	48,5±20,06 ^b
TA-30h	1,0±0,76 ^b	0,5±0,53 ^b	30,0±36,48 ^b	66,3±72,19 ^c	0,2±0,46 ^b	50,9±19,77 ^{ab}

Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente ($p < 0,05$). TA (armazenamento à temperatura ambiente), h (hora), 5°C (armazenamento à 5 graus Celsius).

Tabela 2 – Valores médios e desvios padrão de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade linear progressiva (VSL), velocidade curvilínea (VCL), espermatozóides rápidos (RAP) e integridade de membrana plasmática (IMP) após a centrifugação e a ressuspensão com diluente Botu-Crio[®] nos grupos: controle (0 hora), armazenados à 5°C (5°C-06h, 5°C-12h, 5°C-18h, 5°C-24h e 5°C-30h) e armazenados à temperatura ambiente (TA-6h, TA-12h, TA-18h, TA-24h e TA-30).

Grupos (n=8)	MT (%)	MP (%)	VSL (µm/s)	VCL (µm/s)	RAP (%)
Controle	84,0±5,96 ^a	46,4±6,86 ^a	83,0±5,40 ^a	184,0±15,62 ^{ab}	73,9±8,40 ^a
5°C-06h	77,4±11,29 ^a	33,1±8,92 ^{ab}	80,5±8,83 ^a	201,5±27,80 ^a	66,2±16,43 ^a
5°C-12h	76,6±7,72 ^a	31,4±3,70 ^{ab}	77,4±6,99 ^{ab}	197,0±22,96 ^a	63,6±8,89 ^a
5°C-18h	71,4±14,00 ^a	27,6±9,24 ^{bc}	75,4±8,58 ^{ab}	198,4±22,46 ^a	60,1±17,16 ^a
5°C-24h	68,4±18,73 ^a	27,4±13,72 ^{bc}	71,4±11,13 ^{abcd}	181,1±24,96 ^{abc}	53,4±24,24 ^a
5°C-30h	70,4±21,86 ^a	29,6±13,11 ^b	76,9±9,17 ^{ab}	194,9±21,43 ^a	60,0±23,84 ^a
TA-06h	69,5±16,88 ^a	27,6±9,71 ^{bc}	74,3±9,25 ^{abc}	170,4±50,02 ^{abc}	54,7±20,51 ^a
TA-12h	39,9±17,54 ^b	13,0±7,11 ^{cd}	64,4±4,34 ^{bcd}	161,9±19,39 ^{abc}	23,9±12,64 ^b
TA-18h	24,9±22,76 ^{bc}	6,9±7,43 ^d	60,0±6,46 ^{de}	160,8±17,77 ^{abc}	15,8±18,60 ^b
TA-24h	29,8±24,42 ^{bc}	8,5±8,00 ^d	61,9±7,20 ^{cde}	150,2±23,31 ^{bc}	18,6±20,27 ^b
TA-30h	4,3±2,66 ^c	0,9±0,83 ^d	56,4±6,70 ^e	141,9±19,95 ^c	1,9±1,25 ^b

Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente (p<0,05). **TA** (armazenamento à temperatura ambiente), **h** (hora), **5°C** (armazenamento à 5 graus Celsius).

Tabela 3 – Valores médios e desvio padrão de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade linear progressiva (VSL), velocidade curvilínea (VCL), espermatozóides rápidos (RAP) e integridade de membrana (IMP) após a descongelação, nos grupos: controle (0 hora), armazenados à 5°C (5°C-06h, 5°C-12h, 5°C-18h, 5°C-24h e 5°C-30h) e armazenados à temperatura ambiente (TA-6h, TA-12h, TA-18h, TA-24h e TA-30).

Grupos (n=8)	MT (%)	MP (%)	VSL (µm/s)	VCL (µm/s)	RAP (%)	IMP (%)
Controle	72,4±6,86 ^a	36,2±8,44 ^a	78,7±7,2 ^a	178,7±13,92 ^a	59,2±10,69 ^a	41,4±5,94 ^a
5°C-06h	56,9±13,57 ^{ab}	24,9±10,11 ^{ab}	74,6±10,28 ^{ab}	173,9±24,49 ^{ab}	42,1±15,72 ^{ab}	46,6±9,94 ^a
5°C-12h	51,4±11,84 ^{abc}	24,0±9,65 ^{abc}	73,5±8,29 ^{ab}	175,2±11,71 ^{ab}	38,5±13,40 ^{abc}	40,8±4,59 ^a
5°C-18h	40,1±20,78 ^{abcd}	17,6±11,48 ^{bcd}	65,9±11,59 ^{abcd}	159,3±26,10 ^{ab}	28,1±17,75 ^{bcd}	45,3±12,44 ^a
5°C-24h	52,8±21,86 ^{ab}	21,0±13,11 ^{bc}	68,0±12,61 ^{abc}	162,2±32,70 ^{ab}	36,5±23,26 ^{abc}	45,0±12,42 ^a
5°C-30h	45,8±23,80 ^{abc}	18,7±9,68 ^{bcd}	69,7±11,96 ^{abc}	169,4±29,66 ^{ab}	34,8±21,10 ^{bc}	40,4±8,86 ^a
TA-06h	49,0±13,65 ^{abc}	19,6±6,65 ^{bc}	70,6±6,62 ^{abc}	166,2±26,06 ^{ab}	33,6±13,43 ^{bcd}	43,5±7,95 ^a
TA-12h	25,4±15,60 ^{cde}	10,0±6,97 ^{cdef}	63,5±8,16 ^{bc}	155,1±24,69 ^{ab}	16,7±12,80 ^{cdef}	40,1±3,87 ^a
TA-18h	12,4±16,59 ^e	3,6±5,58 ^{ef}	51,9±9,41 ^d	145,8±19,24 ^{ab}	7,4±11,86 ^{ef}	44,8±10,14 ^a
TA-24h	18,7±15,43 ^{de}	4,8±5,17 ^{de}	61,8±7,79 ^{bc}	144,3±22,55 ^{ab}	9,5±11,19 ^{def}	39,6±9,72 ^a
TA-30h	2,25±2,19 ^e	0,4±0,51 ^f	54,8±5,44 ^c	139,7±22,47 ^b	0,9±1,13 ^f	29,9±13,17 ^a

Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente (P<0,05). **TA** (Armazenamento à temperatura Ambiente), **h** (Hora), **5°C** (armazenamento à 5 graus Celsius).

Não houve diferença na MT tanto pré-congelação quanto pós-descongelação entre o grupo controle (0 hora) e os grupos armazenados a 5°C (5°C-06h, 5°C-12h, 5°C-18h, 5°C-24h e 5°C-30h). Entretanto, foi observada queda significativa da MT nos grupos armazenados a temperatura ambiente a partir de 12 horas de armazenamento (TA-12h, TA-18h, TA-24h e TA-30h) (Figura 6).

FIGURA 6 – Avaliação da porcentagem de espermatozoides móveis (Motilidade Total), recuperados do epidídimo pré-congelação (após a ressuspensão com diluente de congelção; A) e pós-descongelação (B) nos grupos: controle (0 hora), armazenados a temperatura ambiente e a 5°C por 6, 12, 18, 24 e 30 horas antes da recuperação espermática. *diferem significativamente do grupo controle $p < 0,05$.

Não houve diferença na MP tanto pré-congelação quanto pós-descongelação entre o grupo controle (0 hora) e os grupos armazenados a 5°C por até 12 horas (5°C-06h e 5°C-12h). A partir de 18 horas de armazenamento a 5°C (5°C-18h, 5°C-24h e 5°C-30h) e também em todos os grupos armazenados a temperatura ambiente (TA-06h, TA-12h, TA-18h, TA-24h e TA-30h) houve queda significativa deste parâmetro espermático (Figura 7). A queda mais expressiva ocorreu a partir de 18 horas de armazenamento a temperatura ambiente, que obteve espermatozoides com MP $\leq 8,5\%$ na análise pré-congelação (Tabela 2) e $\leq 4,8\%$ na análise pós-descongelação (Tabela 3).

FIGURA 7 – Avaliação da porcentagem de espermatozoides com motilidade progressiva (MP), recuperados do epidídimo pré-congelção (após a ressuspensão com diluente de congelção; A) e após descongelção (B) nos grupos: controle (0 hora), armazenados a temperatura ambiente e a 5°C por 6, 12, 18, 24 e 30 horas antes da recuperação espermática. *diferem significativamente do grupo controle $p < 0,05$.

Não houve diferença na VSL tanto pré-congelção quanto pós-descongelção entre o grupo controle (0 hora) e os grupos armazenados a 5°C (5°C-06h, 5°C-12h, 5°C-18h, 5°C-24h e 5°C-30h). Entretanto, foi observada queda significativa da VSL nos grupos armazenados a temperatura ambiente a partir de 12 horas de armazenamento (TA-12h, TA-18h, TA-24h e TA-30h) (Figura 8).

FIGURA 8 – Avaliação da Velocidade Linear Progressiva (VSL), dos espermatozoides recuperados do epidídimo pré-congelção (após a ressuspensão com diluente de congelção; A) e após descongelção (B) nos grupos: controle (0 hora), armazenados a temperatura ambiente e a 5°C por 6, 12, 18, 24 e 30 horas antes da recuperação espermática. *diferem significativamente do grupo controle $p < 0,05$.

Como demonstrado na Figura 9, foi observada queda da VCL pré-congelação quando o epidídimo foi armazenado a temperatura ambiente por mais de 24 horas. Já no período pós-descongelção, a queda do mesmo só foi observada no grupo armazenado a temperatura ambiente por 30 horas quando comparado com o grupo cuja colheita de espermatozóides do epidídimo foi realizada imediatamente após a orquiectomia (controle, 0 hora).

FIGURA 9 – Avaliação da Velocidade Curvilínea (VCL), dos espermatozóides recuperados do epidídimo pré-congelação (após a ressuspensão com diluente de congelação; A) e após descongelção (B) nos grupos: controle (0 hora), armazenados a temperatura ambiente e a 5°C por 6, 12, 18, 24 e 30 horas antes da recuperação espermática. * diferem significativamente do grupo controle $p < 0,05$.

Na análise realizada pré-congelação o número de espermatozóides rápidos apresentou queda significativa apenas nos grupos em que os epidídimos foram armazenados por 12 horas ou mais a temperatura ambiente (5°C-12h, 5°C-18h, 5°C-24h e 5°C-30h) conforme descrito na tabela 2. Na avaliação pós-descongelção, houve queda da porcentagem de espermatozóides rápidos nos grupos armazenados a 5°C por 18 e 30 horas (TA-18h e TA-30h) e em todos os grupos armazenados a temperatura ambiente quando comparado com o grupo controle (Tabela 3; Figura 10).

FIGURA 10 – Avaliação da porcentagem de espermatozoides rápidos (RAP), recuperados do epidídimo (após a ressuspensão com diluente de congelação; A) e após descongelção (B) nos grupos: controle (0 hora), armazenados a temperatura ambiente e a 5°C por 6, 12, 18, 24 e 30 horas antes da recuperação espermática. *diferem significativamente do grupo controle $p < 0,05$.

Na análise pré-congelação da integridade de membrana plasmática não houve diferença entre o grupo controle (0 hora) e todos os grupos armazenados a 5°C (5°C-06h, 5°C-12h, 5°C-18h, 5°C-24h e 5°C-30h). Foi observado apenas uma inferioridade deste parâmetro no grupo armazenado por 24 horas a temperatura ambiente (TA-24h) (tabela 2). Na avaliação pós-descongelção não foi observada nenhuma diferença entre os grupos (tabela 3 e Figura 11).

FIGURA 11 – Avaliação da porcentagem de espermatozoides com integridade de membrana plasmática (IMP), recuperados do epidídimo (após a ressuspensão com diluente de congelação; A) e após descongelção (B) nos grupos: controle (0 hora), armazenados a temperatura ambiente e a 5°C por 6, 12, 18, 24 e 30 horas antes da recuperação espermática. *diferem significativamente do grupo controle $p < 0,05$.

6.2 Experimento II

O número médio de espermatozóides colhidos com vagina artificial (EJ-0h) foi de $7,8 \pm 4,69 \times 10^9$. Nos epidídimos direitos este valor foi de $11,0 \pm 8,29 \times 10^9$ e de $14,0 \pm 8,99 \times 10^9$ nos epidídimos esquerdos (Figura 12).

O número de espermatozóides colhidos dos ejaculados foi significativamente inferior aos recuperados da cauda dos epidídimos (Epidídimos Direitos + Epidídimos Esquerdos) $25,0 \pm 17,13^a \times 10^9$ ($p < 0,05$).

FIGURA 12 – Média do número de espermatozóides recuperados com vagina artificial (Ejaculado), dos epidídimos direitos (Epidídimos D), dos epidídimos esquerdos (Epidídimos E) e soma dos epidídimos direito e esquerdo (Epidídimos D + E).

A partir dos dados obtidos nos três grupos, foram calculadas as médias e desvios padrão da motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade linear progressiva (VSL), velocidade curvilínea (VCL), espermatozóides rápidos (RAP), Defeitos morfológicos (DEF) e integridade de membrana plasmática (IMP) dos espermatozóides do ejaculado (EJ-0h), espermatozóides recuperados do epidídimo, imediatamente após castração (EP-0h) e espermatozóides recuperados do epidídimo após armazenamento a 5°C por 24 horas (EP-24h). As análises foram realizadas em três

momentos: logo após a recuperação (tabela 4), após centrifugação e ressuspensão com o diluente de congelação (tabela 5) e pós-descongelação (tabela 6).

Tabela 4 - Valores médios e desvios padrão de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade linear progressiva (VSL), velocidade curvilínea (VCL), espermatozóides rápidos (RAP) e espermatozóides com defeitos morfológicos (DEF) logo após a recuperação nos grupos EJ-0h, EP-0h e EP-24h.

Grupos (n=8)	MT (%)	MP (%)	VSL (µm/s)	VCL (µm/s)	RAP (%)	DEF (%)
EJ-0h	79,6±8,53 ^a	43,3±8,32 ^a	99,6±23,63 ^a	183,4±23,63 ^{ab}	70,1±11,03 ^a	15,2±4,38 ^a
EP-0h	29,4±15,58 ^b	9,8±7,90 ^b	68,2±8,83 ^b	205,0±20,11 ^a	20,1±10,56 ^b	11,4±4,56 ^a
EP-24h	23,2±21,56 ^b	6,7±7,45 ^b	62,1±11,58 ^b	159,8±24,71 ^b	14,9±16,08 ^b	10,8±3,15 ^a

Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente (P<0,05). EJ-0h (Espermatozóides do ejaculado coletados por vagina artificial), EP-0h (Espermatozóides recuperados do epidídimo imediatamente após a orquiectomia), EP-24h (Espermatozóides recuperados do epidídimo 24 horas armazenados à 5°C).

Tabela 5 - Valores médios e desvios padrão de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade linear progressiva (VSL), velocidade curvilínea (VCL), espermatozóides rápidos (RAP) e integridade de membrana plasmática (IMP) após a centrifugação e a ressuspensão com diluente de congelação (Botu-Crio[®]) nos grupos EJ-0h, EP-0h e EP-24h.

Grupos (n=8)	MT (%)	MP (%)	VSL (µm/s)	VCL (µm/s)	RAP (%)	IMP (%)
EJ-0h	77,1±8,35 ^a	42,8±8,41 ^a	88,2±6,46 ^a	183,7±20,03 ^a	68,9±12,04 ^a	51,8±18,12 ^b
EP-0h	84,0±5,50 ^a	46,4±6,86 ^a	83,0±5,41 ^{ab}	184,0±15,62 ^a	73,9±8,40 ^a	72,1±10,28 ^a
EP-24h	83,1±7,5 ^a	38,3±7,14 ^a	80,9±6,03 ^b	195,9±14,47 ^a	71,7±9,85 ^a	67,9±13,77 ^{ab}

Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente (P<0,05). EJ-0h (Espermatozóides do ejaculado coletados por vagina artificial), EP-0h (Espermatozóides recuperados do epidídimo imediatamente após a orquiectomia), EP-24h (Espermatozóides recuperados do epidídimo 24 horas armazenados à 5°C).

Tabela 6 – Valores médios e desvios padrão de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade linear progressiva (VSL), velocidade curvilínea (VCL), espermatozóides rápidos (RAP) e integridade de membrana plasmática (IMP) após a descongelação nos grupos EJ-0h, EP-0h e EP-24h.

Grupos (n=8)	MT (%)	MP (%)	VSL (µm/s)	VCL (µm/s)	RAP (%)	IMP (%)
EJ-0h	63,4±16,31 ^a	33,0±10,68 ^a	76,3±5,59 ^a	172,4±14,18 ^a	53,9±17,74 ^a	35,9±6,11 ^b
EP-0h	72,4±6,86 ^a	36,2±8,44 ^a	78,7±7,23 ^a	178,7±13,92 ^a	59,2±10,69 ^a	41,4±5,94 ^{ab}
EP-24h	62,9±10,64 ^a	32,4±9,34 ^a	76,2±4,84 ^a	164,8±10,86 ^a	48,8±12,03 ^a	48,2±7,03 ^a

Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente (P<0,05). EJ-0h (Espermatozóides do ejaculado coletados por vagina artificial), EP-0h (Espermatozóides recuperados do epidídimo imediatamente após a orquiectomia), EP-24h (Espermatozóides recuperados do epidídimo 24 horas armazenados à 5°C).

FIGURA 13 – Média do percentual da motilidade total (A), motilidade progressiva (B) e espermatozóides rápidos (C): obtidos do epidídimo logo após a recuperação, após a centrifugação e pós-descongelação nos grupos EJ-0h, EP-0h e EP-24h.

De acordo com os dados apresentados na Figura 13 foi observado aumento significativo ($p < 0,01$) dos valores médios de motilidade total (A), motilidade progressiva (B) e espermatozóides rápidos (C) após centrifugação em relação às amostras analisadas logo após a recuperação espermática.

As taxas de concepção foram de 61.5% (8/13), 92.3% (12/13) e 61.5% (8/13), nos grupos EJ-0h, EP-0h e EP-24h, respectivamente (Figura 14). Os resultados de fertilidade expressos na Figura 10 indicaram que os espermatozóides recuperados dos epidídimos imediatamente após a orquiectomia tenderam ($0,05 > p < 0,1$) a uma maior taxa de concepção quando comparados aos dos grupos EJ-0h e EP-24h.

FIGURA 14 – Taxas de concepção (%) obtidas nos grupos EJ-0h, EP-0h e EP-24h.

7. DISCUSSÃO

O diluente Botu-Crio® foi utilizado para congelação das amostras espermáticas em todos os grupos nos experimento I e II. Tal escolha baseou-se em estudos realizados com espermatozóides provenientes da cauda do epidídimo que obtiveram melhores resultados com o Botu-Crio® quando comparados aos resultados obtidos com os diluentes EDTA-Lactose e INRA-82 na congelação espermática (MELO et al., 2008; PAPA et al., 2008).

Para o armazenamento dos epidídimos nos grupos que utilizaram refrigeração (5°C-06h, 5°C-12h, 5°C-18h, 5°C-24h e 5°C-30h; Experimento I e EP-24; Experimento II), esta foi realizada com o auxílio do equipamento Botutainer®. Esta escolha deveu-se ao fato de ser um sistema seguro e eficiente na manutenção de sêmen equino a temperatura de 5°C (AVANZI et al., 2006; FARRÁS et al., 2008). A temperatura de 5°C foi mais eficiente na preservação espermática quando comparada a temperatura ambiente, resultado este demonstrado no experimento I e em outros estudos (JAMES et al., 2002; MURADÁS et al., 2006). Além disso, a escolha por este sistema de transporte passivo teve como objetivo facilitar a utilização do protocolo a campo, visto que muitos haras já possuem este equipamento comumente utilizado para transporte de sêmen refrigerado.

A técnica de fluxo retrógrado relatada por Garde et al., (1994) e Bruemmer et al. (2002) foi rápida e eficiente na recuperação de espermatozóides da cauda do epidídimo na espécie equina. O número total de espermatozóides colhidos foi similar ao relatado por Bruemmer et al. (2002) e significativamente superior ao número total de espermatozóides colhidos com vagina artificial (EJ-0h), conforme descrito na figura 12.

7.1 Experimento I

Em muitos casos a distância entre os Haras e laboratórios especializados torna-se uma dificuldade na preservação de espermatozóides do epidídimo. Desta forma, torna-se necessária a avaliação da viabilidade espermática em diferentes temperaturas de armazenamento, permitindo, assim, um transporte mais eficiente deste material.

Com a avaliação dos espermatozóides dos epidídimos armazenados a temperatura ambiente, pode-se estimar quanto tempo os espermatozóides permanecem viáveis em casos de morte súbita dos animais, situação na qual os testículos permanecem a temperatura ambiente até a colheita de espermatozóides do epidídimo.

Alguns trabalhos em equinos relatam o efeito do tempo de armazenamento do epidídimo sobre a viabilidade espermática (JAMES, 2004; GRANEMAN, 2006), mas nenhum comparou epidídimos armazenados a 5°C e a temperatura ambiente, com epidídimos processados imediatamente após orquiectomia justificando o desenvolvimento do experimento I. Além disso, este estudo avaliou a viabilidade espermática após processo de congelação com objetivo de manter células espermáticas viáveis após colheita para uso futuro.

Quando foi realizada a análise comparativa dos parâmetros espermáticos das células recuperadas imediatamente após a orquiectomia, nos grupos mantidos a 5°C foi observada similaridade dos parâmetros de MT, VSL, RAP e IMP até o período de 30 horas de armazenamento. Estes resultados estão em conformidade com os reportados por James (2004), que observou valores semelhantes nos epidídimos armazenados na mesma temperatura por até 96 horas.

A motilidade progressiva foi o parâmetro espermático mais sensível ao armazenamento do epidídimo, apresentando uma diminuição significativa após 12 horas a 5°C e 6 horas a temperatura ambiente, tanto na análise pré quanto pós-congelação. Em

bovinos este parâmetro foi correlacionado positivamente com a fertilidade pós descongelação (KJAESTAD et al., 1993). Entretanto, a capacidade fecundante não possui correlação absoluta com a motilidade espermática (CARVALHO e PAPA, 2003), sendo necessários estudos para avaliar a fertilidade destas células.

De acordo com os dados apresentados na tabela 2, não foi observada diferença significativa na MT e RAP entre os espermatozóides do grupo controle (0 hora) e os espermatozóides recuperados após armazenamento do epidídimo por período de até 12 horas a temperatura ambiente. Os dados obtidos apresentam-se semelhantes aos de Granemann (2006), o qual relatou queda significativa da motilidade e vigor apenas com períodos de armazenamento superiores à 12 horas. Entretanto, no estudo de Granemann (2006) a comparação foi realizada com os espermatozóides do ejaculado, e não com os espermatozóides do epidídimo recuperados imediatamente após a orquiectomia.

Nas análises de integridade de membrana plasmática, avaliada por microscopia de epi-fluorescência (ZÚCCARI, 1998), não foram observadas diferenças significativas na IMP entre os 11 grupos estudados pós-descongelação, indicando que tal parâmetro não sofreu influência do armazenamento do epidídimo até 30 horas, independente da temperatura. Isto corrobora com resultados similares obtidos em estudo realizado por James (2004).

No presente estudo, o armazenamento dos epidídimos a 5°C em sistemas de transporte passivo contribuiu para a diminuição do metabolismo espermático, proporcionando melhor preservação espermática durante o acondicionamento por até 30 horas, observando-se apenas diminuição da motilidade progressiva nos grupos com armazenamento superior a 12 horas. Já os espermatozóides armazenados a temperatura ambiente apresentaram queda significativa e gradativa dos parâmetros MT, MP, VSL e RAP tanto pré como pós congelação a partir de 12 horas de armazenamento.

7.2 Experimento II

No experimento II, a escolha do tempo de 24 horas de armazenamento do grupo 3 (EP-24h) foi fundamentada no experimento I e em trabalhos que não demonstraram diferenças nos parâmetros espermáticos após 24 horas de refrigeração a 5°C (JAMES et al., 2002; BRUEMMER et al., 2002; MURADÁS et al., 2006). Entretanto, nenhum destes estudos comparou a fertilidade dos espermatozóides após a refrigeração do epidídimo. Outro fator relevante na escolha do período de 24 horas de armazenamento foi que este período seria suficiente para o envio do material a laboratórios especializados na colheita e na congelação dos espermatozóides.

Como demonstrado na Tabela 4, a MT, MP, VSL e RAP dos espermatozóides do ejaculado (EJ-0h) foram superiores às encontradas nos espermatozóides recuperados do epidídimo (EP-0h e EP-24h). Esta diferença pode ser explicada pela ausência das secreções das glândulas acessórias, que além da função de transporte, também melhora a motilidade inicial após a ejaculação. Esta hipótese é sustentada pelo trabalho realizado por Tiplady et al, (2002), no qual os espermatozóides colhidos da cauda do epidídimo apresentaram uma melhora dos parâmetros espermáticos 15 minutos após a adição de plasma seminal.

Entretanto, a interferência do plasma seminal sobre a preservação espermática não é a mesma entre os garanhões, podendo ter efeito positivo (HEISE et al., 2010) ou negativo (MONTEIRO et al., 2009b). Essa diferença de resultados pode ser entendida pela grande variabilidade na composição bioquímica deste fluido entre os garanhões (AURICH et al., 1996; ZAHN et al., 2006).

Apesar da inferioridade inicial dos parâmetros espermáticos das células recém-colhidas do epidídimo, após a adição do diluente de congelamento (Botu-Crio[®]) houve melhora significativa dos mesmos (Figura 13), chegando a equiparar-se aos resultados

obtidos com espermatozóides colhidos com vagina artificial. Estes resultados são semelhantes aos relatados por Tiplady et al. (2002); Granemann, (2006), Muradás et al., (2006). A melhora dos parâmetros espermáticos pode ser explicada pela ação de componentes do Botu-Crio[®], capazes de estimular a ativação espermática (GRANEMANN, 2006). Esta função de ativação é exercida pelo plasma seminal em condições fisiológicas durante a ejaculação, como relatado por Tiplady et al. (2002).

A IMP foi superior no EP-0h antes da congelação e no EP-24h após a descongelação, quando comparada aos espermatozóides do ejaculado (Tabela 4). Essas evidências apóiam a hipótese de que os espermatozóides do epidídimo são menos sensíveis ao choque frio e, conseqüentemente, mais resistentes ao processo de congelação (JOHNSON et al, 1980).

A Tabela 4 demonstra que não houve diferença significativa na morfologia espermática entre os grupos estudados no experimento II. Estes achados diferem dos obtidos por estudos realizados em bovinos, que detectaram maior frequência de defeitos morfológicos em amostras do epidídimo quando comparadas ao sêmen do ejaculado (SILVA et al., 2003, MARTINS et al., 2007).

Os resultados obtidos no grupo EP-24h demonstram que a refrigeração dos epidídimos por 24 horas antes da recuperação espermática foi eficiente na manutenção da viabilidade espermática, não sendo observadas diferenças dos parâmetros avaliados quando comparados ao grupo EP-0h. Estes resultados corroboram com achados laboratoriais encontrados em pesquisas anteriores (JAMES et al., 2002; BRUEMMER et al., 2002; BRUEMMER et al., 2006; MURADÁS et al., 2006).

Em relação às variáveis VSL e VCL, que expressam a velocidade espermática ao longo de sua trajetória, não houve diferença entre os espermatozóides recuperados do epidídimo imediatamente após a orquiectomia (EP-0h), com os colhidos com vagina

artificial (EJ-0h), demonstrando que ambos possuem as mesmas características de movimento. Esses resultados diferiram dos obtidos em estudos com a espécie bovina, que apresentou melhor movimento espermático dos espermatozóides provenientes do ejaculado, quando comparado aos do epidídimo (GOOVAERTS et al., 2006).

Os resultados de fertilidade encontrados no experimento II demonstram que os espermatozóides do epidídimo (EP-0h e EP-24h) apresentaram a mesma capacidade fecundante a do ejaculado (EJ-0h) ($p>0,05$). Estes resultados contrastam com os obtidos por Heise et al, (2010), os quais obtiveram menor taxa de concepção com o uso dos espermatozóides recuperados do epidídimo, sem exposição ao plasma seminal, quando comparados com sêmen ejaculado. As diferenças entre a metodologia de processamento dos epidídimos, o diluente de congelação utilizado e o protocolo de inseminação artificial podem ter contribuído para obtenção de diferentes resultados.

As taxas de concepção dos espermatozóides do epidídimo obtidos no presente estudo foram maiores do que as obtidas por estudos anteriores com espermatozóides a fresco (MORRIS et al., 2002; HEISE et al., 2010) ou congelado (BARKER e GANDIER, 1957; MORRIS et al., 2002; HEISE et al., 2010), e semelhantes as observados por Papa et al. (2008). A similaridade entre os resultados do experimento II com os descritos por Papa et al. (2008) pode ser em parte explicada pela utilização dos mesmos diluentes, além do mesmo método de inseminação na extremidade do corno uterino.

A aplicação de 10 mL cloridrato de lidocaína intratesticulares não resultou em variação dos parâmetros espermáticos nos grupos EP-0h e EP-24h, quando comparado ao grupo EJ-0h, contrariando a hipótese de Morris et al. (2002), na qual os autores relataram que a baixa fertilidade obtida através de inseminação utilizando

espermatozóides epididimários poderia ser devido a anestesia local que precede a orquiectomia.

8. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos nos experimentos I e II conclui-se que:

- A técnica de fluxo retrógrado foi rápida e eficiente na recuperação de espermatozóides da cauda do epidídimo, apresentando número de espermatozóides superior ao obtido no ejaculado.
- O armazenamento dos epidídimos a 5°C em sistemas de transporte passivo (Botutainer[®]) proporcionou melhor preservação espermática quando comparado aos mantidos a temperatura ambiente.
- A motilidade progressiva é o parâmetro espermático mais sensível ao tempo de armazenamento, independentemente da temperatura.
- Os espermatozóides recuperados da cauda do epidídimo após 24 horas de refrigeração possuem a mesma capacidade fecundante dos espermatozóides provenientes do ejaculado.
- Os espermatozóides do epidídimo recuperados imediatamente após orquiectomia tendem a apresentar maior taxa de concepção.
- O acondicionamento do epidídimo por 24 horas a 5°C possibilita a preservação de espermatozóides no epidídimo, permitindo que os mesmos sejam enviados de forma eficiente para um centro de reprodução capacitado para a colheita e criopreservação dos mesmos.

9. REFERÊNCIAS

AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoal function. In: McKINNON, A.O.; VOSS, J.L. *Equine reproduction*. Philadelphia: Saunders, 1993. p.715-745.

AURICH, J.E.; KÜHNE, A.; HOPPE, H.; AURICH, C. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. *Theriogenology*, v.46, p.791-797, 1996.

AVANZI, B.R.; PAPA, F.O.; FARRÁS, M.C.; MELO, C.M.; ALVARENGA, M.A.; ELL'AQUA JR., J.A; MEDEIROS, A.S.L.; ARAÚJO, G.H.M. Efficiency of different cooling and storage systems for maintaining equine semen viability in a hot environment. *Animal Reproduction Science*, v.94, p.152-154, 2006.

BARKER, C.A.; GANDIER, S.C.C. Pregnancy in a mare resulting from frozen epididymal spermatozoa. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, v.21, n.2, p.47-51, 1957.

BARRIER-BATTUT, I.; DELAJARRAUD, H.; LEGRAND, E.; BRUYAS, J.F.; TAINTURIER, D.; THORIN, C.; POULIQUEN, H. Calcium, magnesium, copper and zinc in seminal plasma of fertile stallions, and their relationship with semen freezability. *Theriogenology*, v.58, p.229-232, 2002.

BARTELS, P.; LUBBE, K.; KILIAN, I.; FRIEDMANN, Y.; VAN DYK, G.; MORTIMER, D. In vitro maturation and fertilization of lion (*Panthera leo*) oocytes

using frozenthawed epididymal spermatozoa recovered by cauda epididymectomy of an immobilized lion. *Theriogenology*, v.53, n.1, p.325, 2000. (Abstract).

BARTH, A.D.; OKO, R.J. *Abnormal morphology of bovine spermatozoa*. Ames: Iowa State University Press, 1989. 285p.

BLASH, S.; MELICAN, D.; GAVIN, W. Cryopreservation of epididymal sperm obtained at necropsy from goats. *Theriogenology*, v.54, p.889-905, 2000.

BOUÉ, F.; BLAIS, J.; SULLIVAN, R. Surface localization of P34H, an epididymal protein, during maturation, capacitation, and acrosome reaction of human spermatozoa. *Biology of Reproduction*, v.54, p.1009-1017, 1996.

BRUEMMER, J.E.; REGER, H.; ZIBINSKI G.; SQUIRES, E.L. Effect of storage at 5°C on the motility and cryopreservation of stallion epididymal spermatozoa, *Theriogenology*, v.58, p. 405–407, 2002.

BRUEMMER, J.E. Collection and Freezing of Epididymal Stallion Sperm. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, v.22, p.677-682, 2006.

CARVALHO, G.A.; PAPA, F.O. Estudo de diferentes diluentes sobre a viabilidade espermática utilizando-se diversas formas de refrigeração com sêmen eqüino. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.27, p.332-334, 2003.

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 stallions. *The Canadian Veterinary Journal*, v.45, n.1, p.35-41, 2004.

DELL'AQUA JR., J.A.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A.; ZAHN, F.S. Effect of packing systems and thawing temperature on spermatoc parameters and fertility rate of frozen equine semen. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.25 n.1, p.458-460, 2001.

FARRÁS, M.C.; AVANZI, B.R.; MELO, C.M.; DELL'AQUA, J.A.; PAPA, F.O. Efeito de diferentes diluentes na manutenção das características do sêmen equino em dois sistemas de refrigeração passiva. *Ciência Animal Brasileira*, v.9, n.3, p.693-699, 2008.

FERNANDEZ-SANTOS, M.R.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; MATIAS, D.; DOMINGUEZ-REBOLLEDO, A.E.; ESTESO, M.C.; MONTORO, V.; GARDE, J. J. Effects of long-term chilled storage of red deer epididymides on DNA integrity and motility of thawed spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, v.111, p.93–104, 2009.

GAÑÁN, N.; GOMENDIO, M.; ROLDAN, E.R.S. Effect of storage of domestic cat (*Felis catus*) epididymides at 5°C on sperm quality and cryopreservation. *Theriogenology*, v.72, p.1268-1277, 2009.

GARDE, J.; AGUADO, M.; PEREZ, S.; GARRIDO, D.; PEREZ-GUZMAN, M.; MONTORO, V. Physiological characteristics of epididymal spermatozoa from postmortem rams. *Theriogenology*, v.41, n.1, p.2003, 1994.

GOOVAERTS, I.G.F.; HOFLACK, G.G.; VAN SOOM, A.; DEWULF, J.; NICHI, M.; KRUIF, A.; BOLS, P.E.J. Evaluation of epididymal semen quality using the Hamilton-Thorne analyzer indicates variation between the two caudae epididymides of same bull. *Theriogenology*, v.66, p.323-330, 2006.

GRANEMANN, L.C. *Avaliação comparativa do sêmen equino colhido com vagina artificial e por lavado intraluminal da cauda do epidídimo pós-orquiectomia*. 2006. 48f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

GUASTI, P.N.; MONTEIRO, G.A.; DELLAQUA JUNIOR, J.A.; MELO, C.M., MAZIEIRO R.R.D.; MARTIN, J.C.; PAPA, F.O. Viability of equine frozen epididymal sperm treated with pentoxifylline In: CONGRESS OF THE WORLD EQUINE VETERINARY ASSOCIATION - WEVA, 11., Guarujá. *Proceedings ... Guarujá*, 2009, 1 CD – Rom.

GUERRERO, C.A. *Cryopreservation and intracytoplasmic sperm injection with bovine epididymal spermatozoa*. 2006. 202f. Tese (Doutorado) - Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College, Baton Rouge.

HEISE, A.; AHN, W.K.; VOLKMANN, D.H.; THOMPSON, P.N.; GERBER, D. Influence of seminal plasma on fertility of fresh and frozen-thawed stallion epididymal spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, v.118, p.48-53, 2010.

HERRERA, C.; MIRAGAYA, H.M.; CONDE, P.; HYNES, V.; LOSINNO, L.; QUINTANS, C.; PASQUALINI, R.S. Intracytoplasmic injection of in vitro-matured equine oocytes with frozen-thawed epididymal sperm. *Animal Reproduction Science*, v.94, p.299-302, 2006.

HEWITT, D.A.; LEAHY, R.; SHELDON, I.M.; ENGLAND, G.C.W. Cryopreservation of epididymal dog sperm. *Animal Reproduction Science*, v.67, p.101-111, 2001.

HISHINUMA, M.; SUZUKI, K.; SEKINE, J. Recovery and cryopreservation of sika deer (*cervus nippon*) spermatozoa from epididymides stored at 4 °C. *Theriogenology*, v.59, p. 813-820, 2003.

HOLTZ, W.; SMIDT, D. The fertilizing capacity of epididymal spermatozoa in the pig. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.46, n.1, p.227-229, 1976.

JAMES, A.N.; GREEN, H.; HOFFMAN, S.; LANDRY, A.M.; PACCAMONTI, D.; GODKE, R.A. Preservation of equine sperm stored in the epididymis at 4 °C for 24, 48, 72 and 96 hours. *Theriogenology*, v.58, n.2, p.401-404, 2002.

JAMES, A.N. *Preservation of sperm harvested from the rat, caprine, equine and bovine epididymis*. 2004. 229f. Tese (Doutorado) - Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College, Baton Rouge.

JASKO, D.J.; HATHAWAY, J.A.; SCHALTENBRAND, V.L.; SIMPER, W.D., SQUIRES, E.L. Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v.37, p.1241-1252, 1992.

JOHNSON, L.; AMANN, R.P.; PICCKETT, B.W. Maturation of equine epididymal spermatozoa. *American journal Veterinary Research*, v.41, n.8, p.1190-1196, 1980.

JOHNSON, L.; VARNER, D.D.; ROBERTS, M.E.; SMITH, T.L.; KEILLOR, G.E.; SCRUTCHFIELD, W.L. Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. *Theriogenology*, v.60, n.2, p.471-480, 2000.

JONES, R. Plasma membrane structure and remodeling during sperm maturation in the epididymis. *Journal of Reproduction and Fertility*, Suppl. 53, p.73-84, 1998.

KENDALL, N.R.; McMULLEN, S.; GREEN, A.; RODWAY, R.G. The effect of a zinc, cobalt and selenium soluble glass bolus on trace element status and semen quality of ram lambs. *Animal Reproduction Science*, v.62, p.277-283, 2000.

KJAESTAD, H.; ROPSTAD, E.; ANDERSON BERG, K. Evaluation of spermatological parameters used to predict the fertility of frozen bull semen. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v.4, n.3, p.299-303, 1993.

MARENGO, S.R. Maturing the sperm: Unique mechanisms for modifying integral proteins in the sperm plasma membrane. *Animal Reproduction Science*, v.105, p.52-63, 2008.

MARKS, S.L.; DUPUIS, J.; MICKELSEN, W.D.; MEMON, M.A.; PLATZ, C.C. Conception by use of postmortem epididymal semen extraction in a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. v.204, n.10, p.1639-1640, 1994.

MARTINEZ-PASTOR, F.; CORUJO, A.R.D.; ANEL, E.; HERRAEZ, P.; PAZ, P.; ANEL, L. Post mortem time and season alter subpopulation characteristics of Iberian red deer epididymal sperm. *Theriogenology*, v.64, p.958-974, 2005a.

MARTINEZ-PASTOR, F.; GUERRA, C.; KAABI, M.; DIAZ, A.R.; ANEL, E.; HERRAEZ, P.; PAZ, P.; ANEL, L. Decay of sperm obtained from epididymes of wild ruminants depending on postmortem time. *Theriogenology*, v.63, p.24-40, 2005b.

MARTINEZ-PASTOR, F.; MACIAS, V.G.; ALVAREZ, M.; CHAMORRO, C.; HERRAEZ, P.; PAZ, P.; ANEL, L. Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer. *Theriogenology*, v.65, n.3, p.471-485, 2006.

MARTIN, J.C.; KLUG, W.; GÜNZEL, A.R. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.27, suppl., p.47-51, 1979.

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. *Animal Reproduction Science*, v.101, p.326–331, 2007.

MARTINS, C.F.; DRIESSEN, K.; MELO COSTA, P.; CARVALHO-NETO, J.O.; DE SOUSA, R.V.; RUMPF, R.; DODE, M.N. Recovery, cryopreservation and fertilization potential of bovine spermatozoa obtained from epididymides stored at 5 °C by different periods of time. *Animal Reproduction Science*. v.116, p.50-57, 2009.

MAXWELL, W.M.C.; JOHNSON, L.A. Physiology of spermatozoa of a dilution rates: the influence of seminal plasma. *Theriogenology*, v.52, p.1273-1280, 2000.

MELO, C.M.; PAPA, F.O.; FIORATTI, E.G.; VILLAVERDE, A.I.S.B.; AVANZI, B.R.; MONTEIRO, G.; DELL'AQUA JR. J.A.; PASQUINI, D.F.; ALVARENGA, M.A. Comparison of three different extenders for freezing epididymal stallion sperm. *Animal Reproduction Science*, v.107, n.3-4, p.331, 2008.

MONTEIRO, G.A.; GUASTI, P.N.; MELO, C.M.; DELLAQUA JUNIOR, J.A.; MARTIN, J.C.; CARNEIRO, R.; PAPA, F.O. Comparison between cooled sperm from ejaculate and epididymal cauda In: In: CONGRESS OF THE WORLD EQUINE VETERINARY ASSOCIATION - WEVA, 11., Guarujá. *Proceedings ... Guarujá*, 2009a, 1 CD – Rom.

MONTEIRO, G.A.; GUASTI, P.N.; MELO, C.M.; DELLAQUA JUNIOR, J.A.; PAPA,

F.O. Comparison between viability of sperm obtained with artificial insemination and recovered from epididymal cauda of subfertile stallions. In: In: CONGRESS OF THE WORLD EQUINE VETERINARY ASSOCIATION - WEVA, 11., Guarujá. *Proceedings ...* Guarujá, 2009b, 1 CD – Rom.

MONTEIRO, G.A.; GUASTI, P.N.; PAPA, F.O. Colheita e preservação de células espermáticas de garanhões recuperadas da cauda do epidídimo. *Veterinária e Zootecnia*, v.16, n.3, p.448-458, 2009c.

MOORE, I.; SQUIRES, E.L.; GRAHAM, J.K. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. *Theriogenology*, v.63, n.9, p.2372-2381, 2005.

MORRIS, L.; TIPLADY, C.; ALLEN, W.R. The in vivo fertility of cauda epididymal spermatozoa in the horse. *Theriogenology*, v.58, p.643-646, 2002.

MORRIS, L.H.A. Low dose insemination in the mare: an update. *Animal Reproduction Science*, v.82, n.83, p.625-632, 2004.

MURADÁS, P.R.; WEISS, R.R.; KOZICKI, L.E.; GRANEMANN, L.C.; SANTOS, I.W.; PIMPÃO, C.T. Alguns parâmetros de viabilidade de espermatozoides equinos colhidos por vagina artificial e por lavagem da cauda do epidídimo. *Archives of Veterinary Science*, v.11, n.3, p.69-74, 2006.

NEVES NETO, J.R. *Avaliação da congelabilidade e fertilidade do sêmen equino frente a diferentes diluidores*. Botucatu, 1998. 90f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

ORGEBIN-CRIST, M.C. Studies on the function of the epididymis. *Biology of Reproduction*, suppl. 1, p.155–175, 1969.

PAPA, F.O.; ZAHN, F.S.; DELL'AQUA JR, J.A.; ALVARENGA, M.A. Utilização do diluente MP50 para a criopreservação do sêmen equino. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.26, n.3, p.184-187, 2002.

PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A.; CARVALHO, I.M.; BICUDO, S.D.; RAMIRES, P.R.N.; LOPES, M.D. Coloração espermática segundo karras modificado pelo emprego do barbatimão (*Stryphnodendrum barbatiman*). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.40, p.115-23, 1988.

PAPA, F.O., MELO, C.M.; FIORATTI E.G.; DELLA'QUA, J.A.; ZAHN, F.S.; ALVARENGA, M.A. Freezing of stallion epididymal sperm. *Animal Reproduction Science*, v.107, p.293-301, 2008.

PASQUINI, D.F.; MELO, C.M.; PAPA, F.O.; FIORATTI, E.G.; LANDIM-ALVARENGA, F.C., ALVARENGA, M.A.; ZAHN, F.S.; DE VITA, B.. DELL'AQUA JR, J.A Effects of seminal plasma and sperm motility factors on viability of epididymal sperm of stallions, *Animal Reproduction Science*, v.107, n.3-4, p. 338-339, 2008.

SHIVAJI, S. Seminal plasmin: a protein with many biological properties. *Bioscience and Reproduction*, v.8, p.609-618, 1988.

SHRIVASTAV, P.; NADKARNI, P.; WENSVOORT, S. Percutaneous epididymal sperm aspiration for obstructive azoospermia. *Human Reproduction*, v.9, p.2058–2061, 1994.

SILBER, S.J.; DEVROEY, P.; VAN STEIRTEGHEM, A.C. Conventional in vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection for patients requiring microsurgical sperm aspiration. *Human Reproduction*, v.9, p.1905–1909, 1994.

SILVA, A.E.D.F.; DIAS, A.L.; UNANIAN, M.M.; FREITAS, A.R.; BLOCH, C.J. Conteúdo de peptídeos e avaliação morfofisiológica dos espermatozóides do epidídimo e ejaculado de bovinos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.32, p.1890-1900, 2003.

SULLIVAN, R.; SAEZ, F.; GIROUARD, J.; FRENETTE, G. Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. *Blood Cells, Molecules, & Diseases*, v.35, p.1-10, 2005.

TEMPLE-SMITH, P.D.; SOUTHWICK, G.J.; YATES, C.A.; TROUNSON, A.O.; KRETZER, D.M. Human pregnancy by in vitro fertilization (IVF) using sperm aspirated from the epididymis. *Journal in Vitro Fertility Embryo Transfer*, v.2, p.119-122, 1985.

TIPLADY, C.A.; MORRIS, L.H.A.; ALLEN, W.R. Stallion epididymal spermatozoa: pre-freeze and post-thaw motility and viability after three treatments. *Theriogenology*, v.58, n.2, p.225-228, 2002.

YOUNG, W.C. A study of the function of the epididymis. III Functional changes undergone by spermatozoa during their passage through the epididymis and vas deferens of the guinea pig. *The Journal of Experimental Biology*, v.8, p.151–164, 1931.

YU, I.; LEIBO, S.P. Recovery of motile, membrane-intact spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4°C. *Theriogenology*, v.57, 1179-1190, 2002.

ZAHN, F.S.; PAPA, F.O.; MELO, C.M. Blood serum, seminal plasma and sperm membrane protein profiles in stallions: Are they correlated to semen freezability? *Animal Reproduction Science*, v.64, p.64-66, 2006.

ZABLUDOVSKY, N.; ELTES, F.; GEVA, E.; BERKOVITZ E.; AMIT, A.; BARAK, Y. Relationship between human sperm lipid peroxidation, comprehensive quality parameters and IVF outcome. *Andrologia*, v.31, p. 91–98, 1999.

ZÚCCARI, C.E.S.N. *Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática equina*. 1998. 121f. Tese (Doutoramento) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu.

10. TRABALHO CIENTÍFICO

Advances in stallion's epididymal sperm technology

Cely M. Melo, Gabriel A. Monteiro, Bruno R. Avanzi, Priscilla N. Guasti, Marco A. Alvarenga, José A. Dell'Aqua Jr, Fabiola S. Zahn and Frederico O. Papa

Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology, São Paulo State University, SP, Brazil

Summary

Freezing epididymal sperm is a method to preserve germplasm from animals with not only high genetic potential but also endangered species. In the equine some owners have chosen this possibility in cases of either severe illness or death of stallions. However, the lack of knowledge and poor published results of such technique hampers its propagation. New procedures have allowed some improvement on fertility rates of frozen sperm from the epididymis of stallions. The aim of this study is to report the advances on processing and cryopreservation of samples from the stallion's epididymal semen.

Keywords: epididymis, cryopreservation, stallion, fertility, semen extenders, artificial insemination

Fortschritte in der Technologie von Nebenhodensperma beim Hengst

Das Einfrieren von Nebenhodensperma ist eine Methode, die es erlaubt, Erbinformationen von Tieren mit außergewöhnlich hohem genetischen Potential sowie von bedrohten Tierarten zu konservieren. Beim Pferd wird diese Möglichkeit von einigen Besitzern bei schwerer Krankheit oder Tod des Hengstes genutzt. Jedoch wird die Propagierung dieser Methode durch den mangelhaften Wissenstand sowie wenige publizierte Daten gehemmt. Neuere Verfahren erlauben eine gewisse Verbesserung der Fertilitätsraten anhand gefrorenen epididymalen Spermas von Hengsten. Ziel dieser Studie ist, den Fortschritt in der Methodik zur Aufbereitung und Konservierung von Proben aus dem Nebenhoden des Hengstes zu beschreiben.

Schlüsselwörter: Epididymis, Gefrierkonservierung, Hengst, Fruchtbarkeit, Samenextender, künstliche Insemination

Introduction

Unexpected death, catastrophic injury, castration or any other event that makes both semen collection and mating impossible can be costly in terms of the potential loss of genetically valuable stallion genes. In such circumstances, owners may request a final semen collection to allow propagation of valuable germplasm (Cary et al. 2004). There are limited data regarding survival and fertility of frozen-thawed epididymal stallion sperm, although the first pregnancy using frozen-thawed stallion spermatozoa was reported in a mare inseminated with epididymal spermatozoa (Barker and Gandier 1957). Stallion sperm capable of fertilization can be harvested from the cauda epididymis (Barker and Gandier 1957, Johnson et al. 1980) and stored for future use, preserving valuable gene pool. The timing and, often, location for either castration or post-mortem tissue recovery are not always appropriate for sperm handling and preservation.

Over the years, different techniques for semen collection and cryopreservation have been developed, but few researches have focused on obtaining and freezing epididymal sperm cells from stallions. Therefore, the aim of the present study is to review the recent advances in preservation of equine epididymal sperm.

Epididymal removal and shipment

After the removal of epididymides and testicles it is necessary to ligate the ductus deferens using suture material to avoid

the loss of sperm cells. The ligature should be performed the farthest possible from epididymal cauda, once viable sperms can be obtained from this region. The testicles and epididymides should be rinsed using an isotonic solution, as lactated Ringer's or saline solution, to remove blood and contaminants. They should then be put into plastic bags or rectal gloves, with less minimal air possible (Eichelberger et al. 2007).

Epididymides can be either shipped in passive cooling devices to a specialized facility or processed immediately (Bruemmer 2006). Samples obtained from epididymides of different species can be stored at 5°C for 24 hours prior to cryopreservation (Marks et al. 1994, Blash et al., 2002, Sharma et al., 2007, Papa et al., 2008). However, there is a significant decrease after 12 hours of storage at room temperature on the sperm parameters at 5°C (Monteiro et al., 2009a).

Collection of epididymal sperm

Sperm from terminal stallions may be obtained via electroejaculation (Cary et al. 2004), chemical ejaculation (Card et al. 1997, McDonnell 2001) or by the collection of sperm from cauda epididymides (Morris et al. 2002, James et al. 2002, James 2004, Muradás et al. 2006, Papa et al. 2008). Electroejaculation is a widely spread and successful method for semen collection in some species like the bovine and the ovine, but its use in stallions is not advisable due to the risks for both the animal and practitioner (Stover et al. 1981).

According to Cary et al. (2004), electroejaculation is not an efficient technique to obtain viable sperm, since semen is contaminated with urine even when ejaculation is achieved. In the same experiment, viable sperm was obtained from cauda epididymides, allowing cryopreservation of sperm from valuable stallions, whose semen collection was unsuitable.

Several methods of sperm recovery from cauda epididymis have been described, including aspiration (Sharma et al., 1997), flotation – in which sliced epididymis is placed on gel medium for some time (Hewitt et al., 2001), and retrograde flush of the cauda – in which pressure is generated by a syringe attached to the vas deferens and sperm is carried by the extender and expelled through a cut on the junction of cauda and corpus (Garde et al. 1994).

Martinez-Pastor et al. (2006) compared the retrograde flush and flotation techniques for the recovery of epididymal sperm and they have obtained a higher number of sperm using retrograde flush. In addition, the sample obtained by this technique did not present other cell types, which may be considered an important advantage of this technique.

Several studies have shown that equine epididymal sperm remains viable at room temperature for 24h after orchiectomy (Muradás et al. 2006, Neild et al. 2006, Papa et al. 2008), and thus can be used for artificial insemination of either fresh or frozen sperm (Barker and Gandier 1957, Morris et al. 2002, Papa et al. 2008). Besides, another study demonstrated that the number of spermatozoa recovered from the cauda epididymis is higher than the one recovered from artificial vagina on a single collection (Muradás et al. 2006). If cauda epididymis sperm recovery is the last chance to obtain viable spermatozoa from a stallion, it is of utter importance to test protocols to enhance the success rates of this technology in stallions.

It has also been demonstrated that spermatozoa obtained from stallion epididymis after dilution with suitable extender present similar progressive motility when compared to ejaculated sperm obtained by artificial vagina (Morris et al. 2002).

Due to a lack of information concerning the storage capability of epididymis and total number of spermatozoa that can be obtained from the epididymal tail, Papa et al. (2008) correlated testicular volume (length×width×height) and testicular weight with the recovery of epididymal spermatozoa retrieval

(Table 1 and 2). Testes were obtained during routine castration from twenty-two Brazilian jumping horses aging approximately 3 years old. The authors observed a positive correlation between testicular volume and weight. Testicular parameters are described on table 1.

Preservation of epididymal sperm

Bruemmer et al. (2002) tested the cryopreservation of equine sperm collected from cauda epididymis. After collection, some of the samples were frozen directly and the others were stored for 24h at 5°C before freezing, using INRA 82 and EDTA-Lactose extenders. The authors observed that storage at 5°C did not affect total and progressive motility when compared to the samples that had been directly frozen. Papa et al. (2008) observed an increase in pre- and post-freezing results of samples frozen with Botu-Crio® when compared to EDTA-Lactose and INRA-82.

In order to verify the effect of storage time at 4°C, James et al. (2002) collected cauda epididymis sperm from 17 stallions and stored for a total period of 96h. Samples were analyzed every 24h for progressive motility and viability based on eosin-nigrosin/fast-green staining. Both motility and viability significantly decreased between consecutive periods but the authors concluded that it was possible to freeze epididymal sperm up to 96h after collection, if it is maintained at 4°C.

Epididymal sperm presents very poor motility, which is probably due to the lack of exposure to activating factors present in the seminal plasma (Stout et al. 1999). Some studies have been investigating the influence of seminal plasma (Stout et al. 1999, Papa et al. 2008) and sperm motility factors such as caffeine, progesterone, PHE (penicillamine, hypotaurine and epinephrine) and heparine (Papa et al. 2008).

Pasquini et al. (2008) compared the influence of motility enhancing media on freezability of epididymal sperm and concluded that incubation in Talp + P4, Fert-Talp and Sperm-Talp media, commonly used in IVF procedures, improved equine epididymal sperm motility after freezing (Table 3). Based on these results, Melo et al. (2009) evaluated the influence of those substances on epididymal sperm from subfertile stallions after freezing and verified a pre and post-thaw motility improvement when samples were incubated with Sperm-Talp and Fert-Talp in comparison to ejaculated frozen

Table 1 Mean ($\pm$ SD) testicle parameters from equine testis collected post-castration
Mittelwerte ($\pm$ SD) testikulärer Parameter von durch Kastration gewonnenen equinen Hoden

Testicle parameters							
Left				Right			
Length (cm)	Height (cm)	Width (cm)	Weight (g)	Length (cm)	Height (cm)	Width (cm)	Weight (g)
9.5 $\pm$ 1.0	6.2 $\pm$ 0.7	5.1 $\pm$ 0.5	195.0 $\pm$ 62.5	9.1 $\pm$ 1.5	5.8 $\pm$ 1.2	4.9 $\pm$ 0.8	183.2 $\pm$ 75.2

Table 2 Mean ($\pm$ SD) parameters from equine epididymal flush collected post-castration
Mittelwerte ($\pm$ SD) von Parametern equiner epididymaler Spülproben nach Kastration

Semen parameters		
Epididymal Flush (mL)	Concentration (sperm/mL $\times 10^6$)	Total sperm number (sperm $\times 10^9$)
51.1 $\pm$ 7.5	103.5 $\pm$ 78.1	4.8 $\pm$ 3.3

Table 3 Mean ($\pm$ SD) values of post-thaw total motility (TM), progressive motility (PM), curvilinear velocity (VCL), straight line velocity (VSL) and percentage of rapid cells (RAP) of equine epididymal sperms incubated with different media and frozen with Botucio extender
 Mittelwerte ($\pm$ SD) nach dem Auftauen: Gesamtmotilität (TM), vorwärtsbewegliche Spermien (PM), kurvilineare Geschwindigkeit (VCL), lineare Geschwindigkeit (VSL) und Prozentsatz schneller Zellen (RAP) von equinen epididymalen Spermien nach Inkubation mit verschiedenen Medien und Einfrieren mit Botucio-Verdünner

Group	TM (%)	PM (%)	VSL (μ m/s)	VCL (μ m/s)	RAP (%)
Control	44.6 $\pm$ 13.2 ^b	19.2 $\pm$ 5.7 ^{bc}	71.7 $\pm$ 3.0 ^{ab}	167.6 $\pm$ 7.9	30.9 $\pm$ 9.9 ^b
P4	49.9 $\pm$ 5.0 ^{ab}	21.7 $\pm$ 2.3 ^{abc}	72.6 $\pm$ 2.1 ^{ab}	169.9 $\pm$ 7.4	35.1 $\pm$ 4.5 ^{ab}
Plasma	46.2 $\pm$ 12.9 ^b	17.7 $\pm$ 5.1 ^c	68.0 $\pm$ 5.6 ^b	161.3 $\pm$ 17.8	30.1 $\pm$ 12.2 ^b
Fert	58.2 $\pm$ 7.9 ^{ab}	24.7 $\pm$ 4.2 ^{ab}	73.0 $\pm$ 4.7 ^{ab}	169.7 $\pm$ 13.0	42.0 $\pm$ 8.8 ^{ab}
Talp	61.7 $\pm$ 7.1 ^a	26.4 $\pm$ 1.6 ^a	74.4 $\pm$ 2.5 ^a	175.4 $\pm$ 10.4	45.4 $\pm$ 6.6 ^a

* Different letters in a column differ significantly ($P < 0.05$). Control (Botu-Semen); P4 (Talp + Progesterone); Plasma (Seminal Plasma); Fert (Fert-Talp); Talp (Sperm-Talp)

Table 4 Mean values for Total Motility (TM), Progressive Motility (PM) and Plasma Membrane Integrity (PMI) of ejaculated and frozen-thawed epididymal semen from poor freezer stallions incubated with Botu-Semen (BS), Talp + caffeine (Sp) and Talp + Heparine + PHE (Fert)
 Mittelwerte der Gesamtmotilität (TM), vorwärtsbeweglicher Spermien (PM) und der Plasmamembranintegrität (PMI) von ejakuliertem und tiefgefrorenem epididymalen Samen von Hengsten mit schlechter Samengefriervereignung nach Inkubation mit Botu-Samenverdünner (BS), Talp + Koffein (Sp) und Talp + Heparin + PHE (Fert)

	TM	PM	PMI
Ejaculate	7.7 $\pm$ 2.21 ^c	1.7 $\pm$ 1.26 ^b	22.3 $\pm$ 6.02 ^b
BS	33.3 $\pm$ 2.10 ^b	12.5 $\pm$ 3.31 ^a	41.7 $\pm$ 10.59 ^a
Sp	41.3 $\pm$ 3.77 ^a	14.3 $\pm$ 2.61 ^a	41.5 $\pm$ 2.38 ^a
Fert	42.0 $\pm$ 1.63 ^a	15.25 $\pm$ 3.94 ^a	47.2 $\pm$ 2.87 ^a

* Different letters in a column differ significantly ($P < 0.05$)

Table 5 Mean values for Total Motility (TM), Progressive Motility (PM) and Plasma Membrane Integrity (PMI) of semen collected with artificial vagina (G1), recovered from epididymal cauda immediately post-orchietomy (G2) and recovered from epididymal cauda stored for 24 hours at 5°C (G3).

Mittelwerte der Gesamtmotilität (TM), vorwärtsbeweglicher Spermien (PM) und der Plasmamembranintegrität (PMI) von Sperma gewonnen mit Hilfe der künstlichen Vagina (G1), aus dem Nebenhodenschwanz unmittelbar nach Kastration (G2) und aus dem Nebenhodenschwanz nach Aufbewahrung bei 5°C für 24 Stunden (G3)

	TM	PM	PMI
G1	60.2 $\pm$ 16.99 ^b	30.8 $\pm$ 14.22 ^b	41.2 $\pm$ 20.32 ^b
G2	85.1 $\pm$ 5.85 ^a	46.1 $\pm$ 8.46 ^a	74.9 $\pm$ 10.49 ^a
G3	83.1 $\pm$ 7.52 ^a	38.3 $\pm$ 7.14 ^{ab}	71.7 $\pm$ 9.85 ^a

* Different letters in a column differ significantly ($P < 0.05$)

semen, probably due to the deleterious effect of seminal plasma in poor semen stallions (Table 4).

Pentoxifylline is a substance that promotes the increase of the AMPc, which is responsible for the spermatid motility, being able to stimulate recently recovered immobile spermatozoa. The use of a skim-milk extender containing pentoxifylline, Botu-Turbo (BT) for equine epididymal semen increased total and progressive motility in comparison to the skim-milk extender Botu-Semen (B). Sperm parameters of the flushed samples with BT and B immediately after flushing for Total Motility (TM) were 47.4 $\pm$ 22.8 vs 19.2 $\pm$ 14.1. As for the Progressive Motility (PM) they were 16.7 $\pm$ 9.5 vs 6.5 $\pm$ 7.2. After 15 minutes of incubation at 37°C sperm values for TM, PM were 67.4 $\pm$ 21.9 vs 48.7 $\pm$ 29.1 and 22.6 $\pm$ 10.0 vs 12.4 $\pm$ 8.8, respectively (Guastri et al. 2009).

A recent study conducted by Monteiro et al (2009a) compared post-refrigeration viability of ejaculated sperm collected by artificial vagina and epididymal sperm recovered immediately after castration. Parameters (total and progressive motility and membrane integrity) of epididymal sperm cooled at 5°C for both 24 and 48h were significantly superior to those

from ejaculated sperm ($P < 0.05$), demonstrating that epididymal sperm are less susceptible to damages caused by refrigeration procedures (Table 5).

Influence of seminal plasma on fertility of epididymal sperm

Some authors believe that the reduced fertility of frozen epididymal semen is due to the absence of seminal plasma, the only difference between ejaculated and epididymal sperm. Seminal plasma has an important role on motility, membrane integrity and uterine transport, and its absence shall be deleterious (Aurich 1996, Katila 2001).

The presence of decapacitating factors in the seminal plasma inhibits the sperm capacitation, avoiding the early acrosomal reaction and could prevent fertilization (Oliphant et al. 1985). According to some studies, there is no effect of seminal plasma on epididymal spermatozoa (Cary et al. 2004, Morris et al. 2002, Tiplady et al. 2002 and Volkmann et al. 2001). Seminal plasma can play positive influence upon the fertility of epididymal sperm (Heise et al. 2009), however it is

not strictly necessary to achieve the conception (Morris et al. 2002, Papa et al. 2008).

Fertility of epididymal sperm

Although the first pregnancy with frozen semen in horses was obtained with cauda epididymides sperm, studies in equine semen have been restricted to ejaculated sperm. Only in the last few years studies in recovery and preservation of epididymal sperm have been intensified, in part due to the increasing interest in preservation of endangered species or high valuable genetics, and also owing to the possibility of low dose artificial insemination and ICSI in horses.

Morris (2004) reported a 45% pregnancy rate after hysteroscopic inseminations of mares with 200×10^6 fresh cauda epididymis sperm. Using the same dose but frozen-thawed epididymal sperm, this author obtained pregnancy rates of 18 and 8% when mares were inseminated by hysteroscopy or by conventional method, respectively. This demonstrated the possibility of obtaining pregnancies from epididymal sperm even with low doses.

Papa et al. (2008) reported 66.6% conception rate after inseminations with 400×10^6 viable epididymal sperm cooled for 24h at 5°C pre and post ovulation. A subsequent study was conducted by Monteiro et al. (2009b) in order to compare post thaw fertility of ejaculated sperm (Group 1), epididymal sperm frozen immediately after castration (Group 2) and epididymal sperm frozen after 24h refrigeration at 5°C (Group 3). All inseminations were performed with 800×10^6 viable sperm in the tip of uterine horn. Conception rates were, respectively, 61.5% (8/13), 92.3% (12/13) and 61.5% (8/13) for groups 1, 2 and 3.

Herrera et al. (2006) reported no difference in embryo cleavage rates using ICSI in equine oocytes matured in vitro when frozen cauda epididymal semen, in natura ejaculated or frozen ejaculated sperm were used, demonstrating that epididymal sperm are suitable for ICSI procedures in horses.

Conclusion

Results presented in this review allow us to conclude that cauda epididymis stallion sperm may be successfully used in reproductive biotechnologies, making possible the use of fresh, cooled or frozen sperm from stallions that had their reproductive life interrupted, maintaining the production of genetically superior animals. More studies using lower doses have to be developed aiming to optimize the use of epididymal frozen semen using different technologies, such as artificial insemination, intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization.

References

Aurich J. E., Kühne A., Hoppe H. and Aurich C. (1996) Seminal plasma effects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. *Theriogenology* 46, 791-797
Barker C. A. and Gandier S. C. C. (1957) Pregnancy in a mare resulting from frozen epididymal spermatozoa. *Can. J. Comp. Med.* 21, 47-51

Blash S., Melican D. and Gavin W. (2002) Cryopreservation of epididymal sperm obtained at necropsy from goats. *Theriogenology* 54, 899-905
Brummer J. E., Reger H., Zibinski G. and Squires E. L. (2002) Effect of storage at 5°C on the motility and cryopreservation of stallion epididymal spermatozoa. *Theriogenology* 58, 405-407
Brummer J. M. (2006) Collection and freezing on epididymal stallion sperm. *Ani. Reprod. Sci.* 22, 677-682
Card C. E., Manning S. T., Bowman P. and Leibel T. (1997) Pregnancies from imipramine and xylazine-induced ex copula ejaculation in a disabled horse. *Can. Vet. J.* 38, 171-174
Cary J. A., Madill S., Farnsworth K., Hayna J. T., Duoos L. and Fahning M. L. (2004) A comparison of electroejaculation and epididymal sperm collection techniques in stallions. *Can. Vet. J.* 45, 35-41
Eichelberger A. C., Troedsson M. H., Pazar M. A. and Macpherson M. L. (2007) How to Collect, Handle, and Process Post-Mortem Epididymal Sperm for Breeding or Assisted Reproductive Techniques. *AAEP Proceedings*, 53, 583-586
Garde J., Aguado M., Perez S., Garrido D., Perez-Guzman M. and Montoro V. (1994) Physiological characteristics of epididymal spermatozoa from postmortem rams. *Theriogenology* 41, 203
Guasti P. N., Monteiro G. A., Dell'Aqua Júnior J. A., Melo C. M., Crespilho A. M., Maziero R. R. D., Martin J. C. and Papa F. O. (2009) Viability of equine frozen epididymal sperm treated with pentoxifylline. *Proceedings of 11th Congress of the World Equine Veterinary Association*. Cd-rom
Heise A., Kähn W., Volkmann D. H., Thompson P. N. and Gerber D. (2009) Influence of seminal plasma on fertility of fresh and frozen-thawed stallion epididymal spermatozoa. *Anim Reprod Science*. In press
Herrera C., Miragaya H. M., Conde P., Hynes V., Losinno L., Quintans C. and Pasqualini R. S. (2006) Intracytoplasmic injection of in vitro-matured equine oocytes with frozen-thawed epididymal sperm. *Anim. Reprod. Sci.* 94, 299-302
Hewitt D. A., Leahy R., Sheldon I. M. and England G. C. W. (2001) Cryopreservation of epididymal dog sperm. *Anim. Reprod. Sci.* 67, 101-111
James A. N. (2004) Preservation of sperm harvested from the rat, caprine, equine and bovine epididymis. PhD Thesis. Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College, Baton Rouge, 229
James A. N., Green H., Hoffman S., Landry A. M., Paccamonti D. and Godke R. A. (2002) Preservation of equine sperm stored in the epididymis at 4°C for 24, 48, 72 and 96 h. *Theriogenology* 58, 401-404
Johnson L., Amann R. P. and Pickett B. W. (1980) Maturation of equine epididymal spermatozoa. *Am. J. Vet. Res.* 41, 1190-1196
Katila T. (2001) Sperm-uterine interactions: a review. *Anim. Reprod. Sci.* 68, 267-272
Marks S. L., Dupus J., Mickelsen W. D., Memon M. A. and Platz C. C. Jr. (1994) Conception by use of postmortem epididymal semen extraction in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 204, 1639-1640
Martinez-Pastor F., Macias V. G., Alvarez M., Chamorro C., Herraez P., Paz P. and Anel L. (2006) Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer. *Theriogenology* 65, 471-485
McDonnell S. M. (2001) Oral imipramine and intravenous xylazine for pharmacologically-induced ex copula ejaculation in stallions. *Anim. Reprod. Sci.* 68, 153-159
Melo C. M., Papa F. O., Monteiro G. A., Guasti P. N., Avanzi B. R., Landim-Alvarenga F. C., Alvarenga M. A. and Dell'Aqua Junior J. A. (2009) Improvement of frozen epididymal semen from subfertile stallions using sperm motility factors. *Proceedings of 11th Congress of the World Equine Veterinary Association*. Cd-rom
Monteiro G. A., Guasti P. N., Dell'Aqua Jr. J. A., Melo C. M., Martin J. C., Maziero R. R., Avanzi B. R. and Papa F. O. (2009a) Viability of sperm harvested from epididymal cauda stored in different moments and temperatures. *Proceedings of 11th Congress of the World Equine Veterinary Association*. Cd-rom
Monteiro G. A., Guasti P. N., Melo C. M., Dell'Aqua Jr. J. A., Martin J. C., Carneiro R. and Papa F. O. (2009b) Comparison between cooled sperm from ejaculate and epididymal cauda. *Proceedings of 11th Congress of the World Equine Veterinary Association*. Cd-rom

- Morris L. H. A. (2004) Low dose insemination in the mare: an update. *Anim. Reprod. Sci.* 82, 625-632
- Morris L. H. A., Tiplady C. and Allen W. R. (2002) The in vivo fertility of cauda epididymal spermatozoa in the horse. *Theriogenology* 58, 643-646
- Muradás P. R., Weiss R. R., Kozicki L. E., Granemann L. C., Santos I. W. and Pimpão C. T. (2006) Alguns parâmetros de viabilidade de espermatozoides equinos colhidos por vagina artificial e por lavagem da cauda do epidídimo. *Arch. Vet. Sci.* 11, 69-74
- Neild D., Miragaya M., Chaves G., Pinto M., Alonso A., Gambarotta M., Losinno L. and Agüero A. (2006) Cryopreservation of cauda epididymis spermatozoa from slaughterhouse testicles 24 h after ground transportation. *Anim. Reprod. Sci.* 94, 92-95
- Oliphant G., Reynolds A. B. and Thomas T. S. (1985) Sperm surface components involved in the control of the acrosome reaction. *Am. J. Anat.* 174, 269-283
- Papa F. O., Melo C. M., Fioratti E. G., Dell'Aqua Jr. J. A., Zahn F. S. and Alvarenga M. A. (2008) Freezing of stallion epididymal sperm. *Anim. Reprod. Sci.* 107, 101-111
- Pasquini D. F., Melo C. M., Papa F. O., Fioratti E. G., Landim-Alvarenga F. C., Alvarenga M. A., Zahn F. S., De Vita B. and Dell'Aqua Jr. J. A. (2008) Effects of seminal plasma and sperm motility factors on viability of epididymal sperm of stallions. *Anim. Reprod. Sci.* 107, 338-339
- Sharma R. K., Padron O. F., Thomas A. J. and Agarwal A. (1997) Factors associated with the quality before and after thawing of sperm obtained by microsurgical epididymal aspiration. *Fertil. Steril.* 68, 626-631
- Stout T. A. E., Morris L. H. A., Li X. and Allan R. W. (1999) The effects of seminal plasma on motility and cryopreservability of horse epididymal sperm. In: *Proceedings of the Havemeyer Foundation Workshop: European Equine Gamete Group*, 5-6
- Stover J., Seager S. W. J., Dolensk E. P., Doherty J., Wildt D. F. and Platz C. C. (1981) Electroejaculation and semen evaluation of the Przewalski horse (*Equus przewalski*). *Am. Assoc. Zoo. Vet.* 144-145
- Tiplady C. A., Morris L. H. A. and Allen W. R. (2002) Stallion epididymal spermatozoa: pre-freeze and post-thaw motility and spermatozoa: viability after three treatments (Abstract). *Theriogenology* 58, 225-228
- Volkman D. H., Gerber D. and Erb H. N. (2001) Comparison between freezability of ejaculated and epididymal stallion sperm (Abstract). *Anim. Reprod. Sci.* 68, 340

Frederico Ozanam Papa
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Distrito de Rubião Junior s/n
18618-000 Botucatu SP, CEP
Brazil
papa@fmvz.unesp.br

ANEXOS

ANEXO I

AJUSTE DO HTMA-IVOS-10 PARA ANÁLISE ESPERMÁTICA EM EQUÍNOS

CARACTERÍSTICAS	AJUSTE
Número de pontos examinados 30	30
Contraste das células em relação ao campo 60 pixels	60 pixels
Tamanho mínimo da célula 3 pixels	3 pixels
Contraste para células imóveis 30 pixels	30 pixels
Limite inferior para índice retilíneo 80 %	80 %
Referência para velocidade média (VAP) <70 $\mu\text{m/s}$	<70 $\mu\text{m/s}$
Referência para velocidade lenta (VAP) <30 $\mu\text{m/s}$	<30 $\mu\text{m/s}$
Referência para velocidade lenta (VSL) <20 $\mu\text{m/s}$	<20 $\mu\text{m/s}$
Limite inferior de tamanho 0,62 pixels	0,62 pixels
Limite superior de tamanho 2,98 pixels	2,98 pixels
Limite inferior de intensidade 0,24	0,24
Limite superior de intensidade 1,19	1,19
Limite inferior de alongamento 0%	0%
Limite superior de alongamento 100%	100%
Lentos contados como móveis Não	Não
Magnificação 1,95	1,95

ANEXO II - PREPARO DAS SONDAS FLUORESCENTES

SOLUÇÃO DE ESTOQUE

<i>SOLUÇÕES</i>	<i>CONSTITUINTES</i>	<i>QUANTIDADE</i>
<i>Estoque IP</i>	Iodeto de Propídeo ¹	10 mg
	Solução fisiológica	20 mL
<i>Estoque CFDA</i>	Diacetato de carboxifluoresceína ²	9,2 mg
	DMSO	20 mL
<i>Estoque de Formaldeído</i>	Formalina a 40%	1 mL
	Solução fisiológica	79 mL
<i>Estoque de Citrato de Sódio</i>	Citrato de sódio 3g	3 g
	Solução fisiológica 100mL	100 mL

1 - P 4170 - Sigma

2 - C 5041 – Sigma

SOLUÇÃO DE TRABALHO

<i>SOLUÇÕES</i>	<i>QUANTIDADE</i>
Solução de Citrato de Sódio	96 mL
Solução de formaldeído 10µL	10 µL
Solução de Iodeto de Propídeo 10µL	10 µL
Solução de Carboxifluoresceína 20µL	20 µL