

PRISCILLA RICABONE MURADÁS

**VIABILIDADE E TESTE DE CRIOPRESERVAÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES
COLHIDOS DA CAUDA DO EPIDÍDIMO DE EQUINOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias, Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Romildo R. Weiss

Co-orientadores: Prof. Dr. Ivan Deconto

Prof. Dr. Luiz Ernandes

Kozicki

**CURITIBA
2007**

Dedico este trabalho aos meus pais, Maria de Jesus e Paulo, que apoiaram e incentivaram a realização de meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar, proteger e dar saúde para conquistar os objetivos almejados.

A todos os colegas, professores e funcionários do Hospital Veterinário e da Pós-graduação da UFPR, que contribuíram de alguma maneira para a realização deste experimento.

Ao professor e diretor do Hospital Veterinário da UFPR Rogério Ribas Lange por permitir a utilização das instalações do Hospital Veterinário para a realização do projeto.

Ao colega e Médico Veterinário Luis Carlos Granemann, com a qual partilhei todas as alegrias, tristezas e dificuldades da parceria para a realização desse projeto.

Aos animais, em especial a égua Paloma, que permaneceu nos auxiliando do início ao fim do experimento.

Ao professor Ivan Deconto por conseguir grande parte dos animais utilizados neste experimento, sem sua inestimável ajuda não seria possível à conclusão deste.

Finalmente ao professor, orientador e amigo Romildo Romualdo Weiss, pela oportunidade, confiança e dedicação que depositou em mim, representando muitas vezes o papel de pai para a realização deste sonho.

SUMÁRIO

SINOPSE	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUÇÃO GERAL	5
1.1) JUSTIFICATIVA	6
1.2) OBJETIVOS	6
1.3) ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO	6
2. REVISÃO DE LITERATURA	8
2.1) ESPERMATOGÊNESE E MATURAÇÃO DOS ESPERMATOZÓIDES	8
2.2) COMPONENTES REGULADORES-CONTROLADORES DA ESPERMATOGÊNESE.....	13
2.3) COMPONENTES PROTÉICOS ENVOLVIDOS NA FUNCIONALIDADE DOS ESPERMATOZÓIDES	14
2.4) COMPONENTES PROTÉICOS DO EJACULADO.....	16
2.5) INTEGRIDADE ACROSSÔMICA E DA CROMATINA	17
2.6) COLHEITA DE ESPERMATOZÓIDES DO EPIDÍDIMO.....	18
2.7) VIABILIDADE DOS ESPERMATOZÓIDES DA CAUDA DO EPIDÍDIMO	19
2.8) CONCENTRAÇÃO DOS ESPERMATOZÓIDES COLHIDOS DA CAUDA DO EPIDÍDIMO	21
2.9) TEMPO DE VIABILIDADE DOS ESPERMATOZÓIDES COLHIDOS DA CAUDA DO EPIDÍDIMO	22
2.10) CONGELAMENTO DOS ESPERMATOZÓIDES DO EPIDÍDIMO.....	24
CAPÍTULO 1	26
CAPÍTULO 2	41
CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
REFERÊNCIAS	57

SINOPSE

A recuperação de espermatozóides viáveis do epidídimo é uma técnica importante para a obtenção de reservas genéticas de animais geneticamente valiosos ou de machos de espécies ameaçadas de extinção. Ao longo dos anos as técnicas de colheita de sêmen dos eqüinos foi desenvolvida, desde a massagem das ampolas dos ductos deferentes, camisa peniana, vagina artificial, colheita direta da cavidade vaginal ou uterina, mas nenhum protocolo para a colheita de sêmen do epidídimo de garanhão é descrito, que é uma biotecnologia importante para a reprodução eqüina. Porém antes de se viabilizar uma colheita de espermatozóides da cauda do epidídimo eqüino é necessário conhecer a espermatogênese, maturação dos espermatozóides, viabilidade e métodos de colheita dos espermatozóides.

Neste experimento foram utilizados 10 garanhões com o objetivo de avaliar a diminuição da viabilidade dos espermatozóides do ejaculado e dos espermatozóides epididimais à temperatura ambiente e de comparar a resistência ao teste de congelamento dos espermatozóides do ejaculado com os espermatozóides epididimais. Os animais sofreram orquiectomia bilateral e seus epidídimos foram conservados à temperatura ambiente até o momento da colheita dos espermatozóides da cauda do epidídimo. Os espermatozóides foram separados em três grupos: a) os colhidos com vagina artificial; b) epidídimo esquerdo; c) epidídimo direito. Os parâmetros considerados para a avaliação da viabilidade espermática foram: motilidade, motilidade progressiva, vigor e integridade de acrossoma. Como resultados obtive-se que a motilidade, motilidade progressiva e vigor dos espermatozóides colhidos com vagina artificial diferem significativamente ($p < 0,05$)

dos colhidos dos epidídimos; estes mesmos parâmetros não apresentaram diferença entre os epidídimos direito e esquerdo. Os defeitos de acrossoma dos espermatozóides não apresentaram diferença significativa entre os grupos. A motilidade, motilidade progressiva e os defeitos de acrossoma dos espermatozóides pós-descongelamento não diferiram ($p < 0,05$) entre os três grupos, porém o vigor foi superior no grupo dos espermatozóides colhidos com a vagina artificial; a motilidade progressiva dos espermatozóides recém colhidos, independentemente do grupo a que pertenciam foi significativamente maior do que a dos espermatozóides pós-descongelamento.

Palavras-chave: espermatozóides, garanhão, cauda do epidídimo, congelamento.

ABSTRACT

The recovery of viable spermatozoa of epididymis is one important technique for the attainment of genetic reserves of valuable animals or males of species genetic threatened of extinguishing. Throughout the years the techniques of semen harvest of the equines were developed, since the massage of the blisters of the deferential ducts, peniane shirt, artificial vagina, direct harvest of the vaginal or uterine socket, but no protocol for the semen harvest of epididymis of sire is described, that it is an important biotechnology for the equine reproduction. However before if making possible a harvest of spermatozoa of the tail of epididymis equine it is necessary to know spermatogenesis, maturation of the spermatozoa, viability and methods of harvest of the spermatozoa.

In this experiment 10 sires with the objective had been used to evaluate the reduction of the viability of the spermatozoa of the ejaculate one and the epididymis spermatozoa to the ambient temperature and to compare the resistance with the test of freezing of the spermatozoa of the ejaculate one with the epididymis spermatozoa. The animals had suffered bilateral orchiectomy and it we epididymis had been conserved to the ambient temperature until the moment of the harvest of the spermatozoa of the tail of epididymis. The spermatozoa had been separate in three groups: a) the harvested ones with artificial vagina; b) epididymis left; c) epididymis right. The parameters considered for the evaluation of the spermatic viability had been: motility, gradual motility, vigor and integrity of acrossoma. As results I got myself that the motility, gradual motility and vigor of the spermatozoa harvested with artificial vagina differ significantly ($p < 0,05$) from the harvested ones of epididymis them; these same parameters had not presented difference between epididymis them right and left. The defects of acrossoma of the spermatozoa had not presented

significant difference between the groups. The motility, gradual motility and the defects of acrossoma of the spermatozoa after-unfreeze had not differed ($p < 0,05$) between the three groups, however the vigor was superior in the group of the spermatozoa harvested with the artificial vagina; the gradual motility of the spermatozoa just harvested, independently of the group the one that belonged was significantly bigger of what of the spermatozoa after unfreeze.

Key-words: spermatic cell, epididymis, equine.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O reprodutor, como um dos fatores imprescindíveis na cadeia da produção animal, deve apresentar eficiente potencial de fertilidade “*in vitro*” e “*in vivo*”, que varia de indivíduo para indivíduo em função da qualidade do sêmen (BELLIN *et al.*, 1998).

Ao longo dos anos as técnicas de colheita de sêmen para eqüinos foram desenvolvidas e aperfeiçoadas, desde a massagem das ampolas dos ductos deferentes, camisas penianas, vagina artificial, esponja, colheita direta da cavidade vaginal ou uterina, mas nenhum protocolo para a colheita de sêmen do epidídimo de garanhão é descrito, que é uma biotecnologia importante para a reprodução eqüina.

Com o incremento da inseminação artificial em eqüinos, o processo de diluição, criopreservação e descongelamento do sêmen, na presença ou não do plasma seminal, foi possível minimizar as perdas de material genético quando um animal de grande valor genético for a óbito e dele não possuir material genético anteriormente criopreservado.

Os espermatozóides, para realizarem sua função de fecundar o oócito, devem se apresentar morfológica e funcionalmente normais, características originadas no testículo (espermatogênese) e completadas na passagem pelo epidídimo (maturação) e no contato com as secreções das glândulas anexas (NISHIMUNE e OKABE, 1993).

Para ser possível a manipulação dos espermatozóides da cauda do epidídimo é de fundamental importância conhecer as características morfológicas e bioquímicas dos espermatozóides encontrados nesta porção do epidídimo, para então poder suprir as deficiências existentes.

1.1) Justificativa

A recuperação pós-orquiectomia de espermatozóides viáveis do epidídimo é uma técnica importante de obtenção reserva genética de animais geneticamente valiosos ou de machos de espécies ameaçadas de extinção.

1.2) Objetivos

Os objetivos deste experimento foram:

- a) Avaliar se há diferença ($p < 0,05$), quanto aos parâmetros de viabilidade dos espermatozóides, entre os três grupos (CAPÍTULO 1);
- b) Avaliar se há diferença entre os defeitos de acrossoma dos três grupos (CAPÍTULO 1);
- c) Determinar por quanto tempo é possível recuperar espermatozóides epididimais viáveis após a orquiectomia, sendo os epidídimos mantidos à temperatura ambiente (CAPÍTULO 1);
- d) Analisar se há diferença ($p < 0,05$), entre os três grupos de congelamento (CAPÍTULO 2);
- e) E comparar a motilidade progressiva entre os espermatozóides recém colhidos e os pós-descongelamento (CAPÍTULO 2).

1.3) Estrutura da Dissertação

A primeira parte da dissertação é referente à introdução do assunto que foi pesquisado, em seguida a revisão de literatura geral do trabalho. O capítulo 1 discorre sobre alguns parâmetros de viabilidade de espermatozóides eqüinos

colhidos por vagina artificial e por lavagem da cauda do epidídimo. Já o capítulo 2 trata do teste de criopreservação de espermatozóides colhidos da cauda do epidídimo de eqüinos orquiectomizados. E por último as considerações final do trabalho de uma maneira geral.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1) Espermatogênese e maturação dos espermatozóides

A espermatogênese nos mamíferos é um processo cíclico de multiplicação e diferenciação celular em que as células primordiais ou espermatogônias passam por complexas transformações a nível celular e molecular até a formação de espermatozóides maduros (SHIVAJI *et al.*, 1990).

A formação das células espermáticas ocorre nos túbulos seminíferos (epitélio seminífero) envolvidos pelas células de Sertoli (BARTH e OKO, 1989).

A espermatogênese pode ser dividida em três fases: a fase proliferativa em que a célula primária diplóide, a espermatogônia, passa por repetidas divisões mitóticas para dar origem ao espermatócito; a fase meiótica em que o material genético do espermatócito recombina e segrega para formar a célula haplóide redonda ou espermátide; e a fase espermiogênica em que a espermátide sofre a diferenciação que dará origem a espermátides alongadas, de núcleo condensado e flagelo espécie-específico, ou espermatozóides (RUSSEL *et al.*, 1990).

Para que esta última fase ocorra, as espermátides sofrem uma série de transformações que incluem a formação do complexo de Golgi, da cabeça, do acrossoma e a maturação (KNOLBIL e NEIL, 1993). Esta etapa em que as espermátides arredondadas diplóides se transformam em espermátides alongadas maduras é conhecida como espermiogênese, constando de 14 fases (BARTH e OKO, 1989) até a formação definitiva do espermatozóide que será liberado para o epidídimo.

A fase em que ocorrem as maiores transformações morfológicas (condensação, alongamento da forma) do núcleo e da membrana é a fase

acrossômica. Esta fase é seguida da maturação em que se finaliza a forma da cabeça e condensação da cromatina, a formação da cauda e do pescoço originando o espermatozóide (BARTH e OKO, 1989).

A espermiogênese é a diferenciação morfológica das espermatídes em espermatozóides. Estas espermatídes contêm uma cabeça aerodinâmica com enzimas penetrativas e um núcleo condensado que carrega o genoma masculino e uma cauda responsável pela motilidade (JOHNSON, 1991).

O acrossoma se constitui, tanto na membrana interna como externa, num carreador de proteínas, adquiridas na sua formação e, após, na maturação, imprescindíveis para a interação do espermatozóide e zona pelúcida, reação acrossômica, fusão e penetração no oócito. Portanto, a integridade do acrossoma no processo de fecundação é fundamental para ocorrer à fusão espermatozóide-oócito (NISHIMUNE e OKABE, 1993).

No final da espermiogênese as células espermáticas já possuidoras de flagelo, porém ainda imóveis e inférteis, são liberadas para o lúmen dos túbulos seminíferos pela ação das células de Sertoli. A movimentação destas células é proporcionada pelos fluídos secretados pelas células de Sertoli e pelo movimento contrátil exercido pelas substâncias contidas na cápsula testicular e na camada muscular dos túbulos seminíferos (BARTH e OKO, 1989). Os túbulos seminíferos constituem cerca de 70% do volume do testículo eqüino (JOHNSON, 1991).

Os túbulos seminíferos são conectados à cabeça do epidídimo pela “rete testis”, formada por pequenos dutos eferentes dentro dos quais ocorre a absorção dos fluídos oriundos da “rete testis” e o aparecimento de secreções contendo antígenos (BARKER e AMANN, 1971) e proteínas, ambos necessários ao estabelecimento da motilidade espermática (BALLACHEY *et. al.*, 1988). Portanto,

para alcançarem a cabeça do epidídimo os espermatozóides transitam pelos dutos eferentes, movimento este realizado com o auxílio das células epiteliais ciliadas (RITZEN *et al.*, 1982) e pela contração da musculatura lisa das paredes dos próprios dutos.

Imprescindível à espermatogênese é a presença e expressão de várias proteínas específicas para cada uma das suas fases. Dentre estas proteínas, de extrema importância são as histonas e protaminas que atuam na fase final da espermatogênese. As histonas contidas nas espermatídes de forma redonda são substituídas por protaminas, proteínas nucleares, cujo papel é reorganizar o DNA constituindo uma estrutura altamente condensada (condensação da cromatina), porém ainda biologicamente inerte (WARD *et al.*, 1999). Na substituição da histona pela protamina e condensação da cromatina desempenham papel importante o grupo de proteínas de transição (TP, “transition nuclear proteins”) (YU *et al.*, 1999).

A cromatina nuclear é definitivamente condensada durante o trânsito pelo epidídimo (SELIGMANN *et al.*, 1992). Quando há alteração na estrutura nuclear por fatores mecânicos e químicos, há aumento na habilidade de fecundação e de manter o desenvolvimento embrionário. Portanto, tanto os eventos da espermatogênese quanto à maturação pós-testicular são necessários para a competência das células espermáticas (FRANCAVILLA *et al.*, 1996).

Como existem proteínas específicas para cada fase da espermatogênese, existem genes cuja expressão é imprescindível durante a espermiogênese. A expressão dos genes durante a espermiogênese dá-se ao nível de transcrição e, é mediada por vários fatores, como, por exemplo, à proteína basonuclina, recentemente encontrada nos testículos do homem e ratos, e ainda a proteína STAT (“signal transducer and activation of transcription”). À medida que o processo da

espermioogênese avança, toda vez que alguma proteína for necessária à continuação deste processo, a transcrição cessa e o mRNA torna-se ativo para sintetizar as respectivas proteínas, como acontece, por exemplo, na síntese das protaminas e proteínas de transcrição (MAHONEY *et. al.*, 1998).

O epidídimo (do Grego *epi* dentro e *didymoi* germinativo ou testículo), é um órgão alongado, localizado na superfície do testículo. Ele é monotubular, enrolado em espiral, que transporta os espermatozóides dos vasos eferentes para os vasos deferentes (SULLIVAN *et al.*, 2005). O epidídimo, anatomicamente pode ser dividido em três segmentos: iniciando com a cabeça, onde o espermatozóide adquire motilidade progressiva; corpo que o habilita a fecundar; e segmento final, a cauda, local de armazenamento. As células epididimais são especializadas não só em criar o ambiente para amadurecer o espermatozóide, mas também para realizar a proteção imunológica (SETCHELL e BROOKS, 1988).

Nos mamíferos, o epidídimo possui múltiplas funções: reabsorção dos fluídos dos túbulos seminíferos, promovendo a concentração do sêmen, transporte dos espermatozóides, eliminação dos espermatozóides defeituosos, maturação e armazenamento dos espermatozóides, que é bem ilustrado pelo fato de que os espermatozóides ejaculados sobrevivem por 24 horas ou mais fora do epidídimo, e são mantidos vivos por mais de 15 dias na cauda do epidídimo. Esta funcionalidade é baseada na manutenção do metabolismo com baixa atividade, prevenindo a ativação prematura dos espermatozóides; durante o período de armazenamento o epidídimo acumula espermatozóides suficientes para a cópula. O volume da cauda do epidídimo reflete a capacidade de armazenamento de espermatozóides do macho. Em touros e garanhões o número de espermatozóides armazenados na cauda do epidídimo pode ser suficiente para até 10 ejaculados sucessivos

dependendo da idade, tamanho e atividade reprodutiva do animal (BEDFORD, 1994).

A síntese de proteínas e secreções epididimais no lúmen é regulada por andrógenos testiculares, que variam de um segmento para outro do epidídimo. Isto resulta numa mistura complexa de proteínas epididimais interagindo com o espermatozóide no lúmen do epidídimo. O processo de maturação dos espermatozoides depende de uma seqüência de modificações espermáticas resultantes da interação da superfície do espermatozóide com diferentes fluidos intraluminais (RODRIGUEZ *et al.*, 2001).

O período de tempo para uma espermatogônia ser convertida em um espermatozóide incorporado dentro do lúmen do túbulo seminífero é de 55-57 dias no garanhão. Esse processo de liberação das espermátides no lúmen do túbulo seminífero é chamado de espermição. Aproximadamente nove dias são necessários para o transporte dos espermatozoides através do sistema de ductos, conseqüentemente, uma nova população de espermatozoides pode ser ejaculada após 64-66 dias. Um ejaculado é, conseqüentemente, um composto dos eventos que ocorreram nos dois meses anteriores que influenciaram a espermatogênese quando os espermatozoides estavam sendo formados, e subseqüentemente o seu transporte e maturação através do sistema de ductos (AMANN, 1993; LOVE, 2002).

Bilhões de espermatozoides são produzidos a cada dia (16 milhões de espermatozoides por grama de tecido testicular por dia no garanhão). Muitas das células produzidas são defeituosas e são eliminadas através de apoptose e fagocitose pelas células de Sertoli, e outras são eliminadas no ejaculado (HENINGER *et al.*, 2004).

2.2) Componentes reguladores-controladores da espermatogênese

Recentemente foi observado que as proteínas HSP70 (“heat-shock proteins”), respectivamente a HSP70-2, são necessárias no início da meiose, fato importante que poderá esclarecer a eventuais falhas na formação de espermatozóides em animais criados em climas tropicais (EDDY, 1999).

Com os estudos “in vitro” ficou evidenciada a existência de uma estreita relação entre as células de Sertoli e Leydig mediada por fatores de natureza protéica capaz de influenciar a proliferação e atividade esteroidogênica das células de Leydig (SHARPE, 1993). Estas proteínas de vários pesos moleculares atuam sob efeito do FSH e testosterona, e possuem efeitos mitogênicos (PAPADOPOULOS, 1991). Um outro grupo de proteínas foi observado estimularem a síntese do DNA nas células de Leydig (WU e MURONO, 1994).

Os estudos do mecanismo de regulação hormonal da espermatogênese estabeleceram que o FSH tem como alvo de atuação as células de Sertoli, que contém os receptores para o FSH (TRIBLEY *et al.*, 1999), do LH sendo as células de Leydig (SYLVESTER, 1996) e da testosterona as células de Sertoli e possivelmente as células germinativas (BARTH e OKO, 1989).

No entanto, apesar de se conhecer o envolvimento destes hormônios nos testículos, permanece pouco clara a forma pela qual o estímulo hormonal é recebido pelo epitélio seminífero. Acredita-se que, a principal função do FSH é iniciar o desenvolvimento testicular na fase puberal, sendo que na fase adulta, o FSH estaria mais envolvido na otimização da espermatogênese. Vários autores demonstraram, em experimentos com ratos hipofisectomizados e suplementados com FSH, que este hormônio é capaz de estimular o crescimento dos túbulos seminíferos, de aumentar o número de receptores de LH nas células de Leydig e conseqüentemente

a capacidade secretora de testosterona, de estimular a produção de proteínas ABP (proteínas de ligação androgênica), de controlar a produção de fluídos nos túbulos seminíferos (STF), e diminuir a possibilidade de degeneração das espermatogônias. Ainda, a função exercida pelos dutos eferentes e epidídimo, principalmente a secretora de compostos protéicos específicos como a glicerolfosforilcolina, carnitina e ácido siálico, está na dependência do hormônio testosterona (JEGOU *et al.*, 1983).

2.3) Componentes protéicos envolvidos na funcionalidade dos espermatozóides

No epidídimo onde ocorre o transporte e a maturação dos espermatozóides, isto é, mudanças morfológicas, metabólicas e modificações funcionais, existem várias proteínas que conferem aos espermatozóides a capacidade de motilidade progressiva e habilidade de fecundação (VARRICHIO *et al.*, 1996).

Em bovinos, foi observado que as proteínas que induzem a motilidade progressiva fazem parte do grupo FMP (proteína da motilidade progressiva). Este grupo é constituído de quatro a cinco proteínas agregadas entre si, de baixa massa molecular (37,5 kDa), e cuja atuação juntamente com cAMP induzem a motilidade (SHIVAJI *et al.*, 1990). JAISWAL e MAJUNDER (1998) demonstraram que as proteínas FMP associadas ao bicarbonato proporcionam a motilidade progressiva do espermatozóide. Ainda, sob a influência do baixo nível de cálcio, alto pH e cAMP, na passagem dos espermatozóides pelo corpo do epidídimo, é ativada a proteína kinase que atua na atividade flagelar da cauda do espermatozóide (SHIVAJI *et al.*, 1990).

Ainda ao nível do epidídimo foi descrito o complexo PP1/I2/GSK-3 (fosfatase protéica 1/ inibidor 2/ “glycogen synthase kinase” – 3) de ação ativadora-inibidora, mediada pelos níveis de cAMP, cálcio e pH (VIJAYARAGHAVAN *et al.*, 1996).

Algumas proteínas envolvidas na motilidade apresentam função de proteção (redução de peróxidos) dos espermatozóides como as proteínas SFP (proteínas do fluído seminal, 13 kDa) (SCHONECK *et al.*, 1996) e LDH-C4 (desidrogenase láctica C4), outras como a calmodulina e calsemina ativam os canais de cálcio (SHIVAJI *et al.*, 1990). Ainda os receptores RHAMM (58 kDa) (receptores de hialuronidase) também foram relacionados a motilidade via ácido hialurônico (KORNOVSKY *et al.*, 1994). E estudos recentes apontaram a angiotensina II como tendo propriedade cinéticas (SABEUR *et al.*, 1999) e TPP (tirosina fosforilada), ambas envolvidas na motilidade da cauda (YEUNG *et al.*, 1999), e o TNF α (fator de necrose tumoral α) presente no sêmen como motilidade acima de 50% (LIEBERMANN *et al.*, 1999).

As proteínas são responsáveis pela habilidade dos espermatozóides: se movimentarem, vencerem as barreiras do trato feminino, alcançar o local de fecundação, ligar e fundir-se ao oócito e formar o zigoto (JONES, 1998).

Não menos importante é a atuação das proteínas inibidoras de motilidade como as SMIF (fatores de inibição de motilidade do sêmen), de baixa massa molecular, porém, sugestões têm sido feitas no sentido de que estes fatores possam atuar como selecionadores de espermatozóides durante o processo de fertilização (SHIVAJI *et al.*, 1990).

Recentemente, foi demonstrado que os compostos protéicos secretados nos dutos eferentes (antígenos e proteínas) são imprescindíveis á capacidade de fecundar dos espermatozóides. A fertilina (MYLES e PRIMAKOFF, 1997), pró-acrosina (KALAB *et al.*, 1994) e β 1,4-galactosiltransferase (MILLER e SHUR, 1994),

além do antígeno PH20/2B1 (PHELPS e MYLES, 1987) e as proteínas sp56 (CHENG *et al.*, 1994) e p95 (KALAB *et al.*, 1994), participam da lista destes compostos.

2.4) Componentes protéicos do ejaculado

O plasma seminal serve como meio de transporte, estimula o metabolismo das células espermáticas e as supre dos nutrientes necessários a sua passagem pelo trato genital feminino. Este é importante também, para manter a capacidade do espermatozóide se movimentar e habilidade de alcançar, reconhecer e se ligar ao oócito. Ao saírem do epidídimo os espermatozóides percorrem o vaso deferente em direção a uretra. Da passagem pelo epidídimo até a ejaculação, os espermatozóides recebem as secreções das glândulas anexas, que formam o plasma seminal, constituído de aminoácidos, peptídeos, compostos iônicos e proteína (MAXWELL e JOHNSON, 2000).

As secreções das glândulas anexas estão controladas por hormônios andrógenos e, na maioria das espécies, são constituídas de açúcares (frutose), proteínas, ácido cítrico, prostaglandina, fosfatases, minerais, ATP e amino ácidos livres (SHIVAJI *et al.*, 1990).

Recentemente, foi identificada uma proteína de ligação localizada na membrana plasmática do oócito (POMP) que atua como receptora de espermatozóides (BERGER *et al.*, 1999) e duas proteínas, fertilina α e β , do grupo MDC (metaloprotease, desintegrina e cisteína), cujo papel é a interação da membrana espermatozóide-oócito, conseqüentemente a fusão (EVANS *et al.*, 1999).

Considerando o número de proteínas contidas no ejaculado e mesmo no trato genital feminino, torna-se impossível enumerar todas que participam do mecanismo

da fertilização. No entanto, será ainda mencionado um grupo de proteínas cuja função foi exaustivamente estudada. Trata-se das proteínas GAGs (proteoglicanos e glicosaminoglicanos) envolvidas na capacitação, além de regular a seleção e motilidade dos espermatozóides (RODRIGUEZ-MARTINEZ *et al.*, 1998).

Muitos estudos mostraram que os espermatozóides epididimais são capazes de fecundar o oócito após sua remoção do epidídimo (MARTINS *et al.*, 2003; KIKUCHI *et al.*, 1998). Por isso, o plasma seminal pode não conter fatores essenciais para a fertilização, mas as secreções otimizam as condições para a motilidade, sobrevivência e transporte dos espermatozóides tanto no trato reprodutivo masculino, como no feminino (EWING e CHANG, 1986). A existência destes fatores, que aumentam a viabilidade dos espermatozóides, é importante, principalmente, quando submetidos a congelação (ASHWORTH *et al.*, 1994; MAXWELL e JOHNSON, 2000), e quando apresentam baixa concentração (GARDNER *et al.*, 1999).

2.5) Integridade acrossômica e da cromatina

Outros fatores, que podem afetar a eficiência da funcionalidade espermática e conseqüente da taxa de fecundação “in vivo” e “in vitro”, são a integridade acrossômica e da cromatina.

Mesmo o sêmen apresentando espermatozóides morfológicamente normais, pode apresentar danos no acrossôma e na condensação da cromatina, que são responsáveis por casos de subfertilidade (GLEDHIL, 1970; BALLACHEY *et al.*, 1988). Um exemplo é a capacitação prematura e ausência da membrana acrossomal externa sob o efeito do estresse de congelação e descongelação, que provocam queda na taxa de fertilidade (THUNDTHIL *et al.*, 1999). E, existe alta

correlação ($r=0,68$) entre integridade acrossômica, normalidade e motilidade (NAGY *et al.*, 2000).

Quando à cromatina, uma das maiores causas da morte embrionária precoce é a deposição da cromatina anormal no oócito (QIU *et al.*, 1995). Segundo KARABINUS *et al.* (1997), o estresse de temperatura acarreta alterações morfológicas e bioquímicas desde a espermatogênese e, como consequência, além da diminuição da motilidade, a degradação do DNA.

2.6) Colheita de espermatozóides do epidídimo

A colheita de espermatozóides epididimais pode ser a última chance para assegurar a preservação do material genético após lesão ou morte do reprodutor. Estudos têm demonstrado que espermatozóides epididimais podem ser usados na inseminação artificial, fertilização "*in vitro*" e injeção intracitoplasmática de espermatozóides com resultados satisfatórios (JAMES *et al.*, 2002).

A primeira dificuldade na utilização dos espermatozóides epididimais é a obtenção dos espermatozóides da cauda do epidídimo. Muitos métodos de recuperação são descritos e variam dependendo do autor e da espécie animal. No caso dos pequenos animais devido ao tamanho do epidídimo, o método de preferência (flutuação) consiste em cortar ou fatiar a cauda do epidídimo e deixar repousar em um meio gelatinoso, desta maneira, os espermatozóides migram para o meio e são recuperados através de filtração (YU e LEIBO, 2002). Esta técnica também é usada para obter amostras de espermatozóides de grandes animais (SILVA *et al.*, 2003).

Uma técnica similar consiste em fazer numerosos cortes na cauda do epidídimo e pressionar suavemente a cauda e colher os espermatozóides por

extravasamento (KAABI *et al.*, 2003). Outra possibilidade é usar uma agulha e perfurar os túbulos (BARTELS *et al.*, 2000). KISHIKAWA *et al.* (1999), utilizaram pinças para comprimir a cauda do epidídimo de ratos e recuperar os espermatozóides.

Outro método consiste em promover um fluxo retrógrado na cauda do epidídimo aplicando pressão nos vasos deferentes até que o conteúdo da cauda saia através de um corte feito na junção com o corpo do epidídimo (GARDE *et al.*, 1994). A pressão é gerada com uma seringa, que injeta ar ou algum líquido não prejudicial aos espermatozóides ou algum tipo de diluente (LAMBRECHTS *et al.*, 1999; COMIZZOLI *et al.*, 2001).

MARTINEZ-PASTOR *et al.* (2006), demonstraram que a colheita de espermatozóides da cauda do epidídimo através do fluxo retrógrado é a técnica mais indicada, pois as amostras obtidas são menos contaminadas e de melhor qualidade seminal em relação aos outros métodos. Possui a limitação de ser usada para grandes animais devido ao tamanho do epidídimo e ser mais complexa que as outras técnicas.

No experimento de GRANEMANN *et al.*, (2006) a colheita de espermatozóides da cauda do epidídimo de eqüinos através da técnica modificada de fluxo retrógrado, pôde ser realizada de maneira rápida e eficiente.

2.7) Viabilidade dos espermatozóides da cauda do epidídimo

Quando colhemos espermatozóides epididimais, estes não contêm o plasma seminal, que além de dar volume ao ejaculado, contém substâncias que aumentam a sobrevivência do espermatozóide no trato genital feminino (KATILA *et al.*, 2002).

Existem diferenças nas características entre o sêmen ejaculado e os espermatozóides da cauda do epidídimo de touros, sendo que o primeiro possui maior motilidade, motilidade progressiva e vigor. Também existem diferenças nos parâmetros entre dois epidídimos de um mesmo animal (GOOVAERTS *et al.*, 2006).

HORN *et al.* (2002), avaliaram a intensidade da redução de células espermáticas defeituosas ao longo do epidídimo de touros e constataram redução significativa no percentual de gota citoplasmática proximal, distal e no total de defeitos ao longo do epidídimo de touros com espermatogênese normal.

SILVA *et al.* (2003), comparando o sêmen ejaculado e os espermatozóides da cauda do epidídimo de touros nelore, observaram que a motilidade total dos espermatozóides do ejaculado era significativamente maior do que a do epidídimo, já os espermatozóides do epidídimo apresentaram uma maior porcentagem de alterações espermáticas, com um elevado número de gotas citoplasmática distal e proximal.

MOGHADAM *et al.* (2005), demonstraram que a motilidade dos espermatozóides epididimais não tem efeito sobre a taxa de fecundação na fertilização “*in vitro*” ou injeção intacitoplasmática de espermatozóides.

A recuperação *post mortem* de espermatozóides epididimais tem sido utilizada em várias espécies de cervídeos selvagens, tendo os espermatozóides recuperados ótima capacidade de fertilização (ASHER *et al.*, 2000).

BRIZ *et al.* (1996), observaram as malformações espermáticas em diferentes regiões do epidídimo (cabeça, corpo e cauda) de varrões sexualmente maduros a fim de determinar a origem das malformações e observaram que existem diferenças entre a frequência de alguns tipos de malformações e a região de origem no epidídimo, já algumas malformações são distribuídas uniformemente ao longo do

epidídimo. As malformações de origem secundária aumentam na cauda do epidídimo, e as de origem primária, com exceção da cauda dobrada, são constantes ao longo do epidídimo.

PRUNEDA *et al.* (2005), estudaram os efeitos da alta frequência de colheita de sêmen no processo de maturação dos espermatozóides ejaculados e de espermatozóides obtidos em diferentes regiões do epidídimo de varrões e observaram que a alta frequência de colheita afetou a motilidade dos espermatozóides e a presença de gotas citoplasmáticas dos espermatozóides ao longo do epidídimo. A motilidade aumentou de 12% na cabeça do epidídimo para 82% na cauda, aproximando-se dos 90% do ejaculado. Cerca de 90% dos espermatozóides da cabeça do epidídimo tinham gota citoplasmática e essa porcentagem diminuía à medida que transitavam pelo epidídimo.

Os espermatozóides colhidos da cauda do epidídimo de garanhões têm motilidade semelhante a dos espermatozóides ejaculados, entretanto, têm fertilidade menor. Os espermatozóides epididimais precisam ser adicionados ao plasma seminal ou outro diluente para melhorar a capacidade de fertilização (TIPLADY *et al.*, 2002).

MORRIS *et al.* (2002), inseminaram éguas com espermatozóides epididimais a fresco com e sem plasma seminal e criopreservados com e sem plasma seminal, obtendo taxas de gestação de 56%, 36%, 21% e 17% respectivamente.

2.8) Concentração dos espermatozóides colhidos da cauda do epidídimo

Em vista das implicações moleculares sofridas pelo estresse de temperatura, é importante o número mínimo de espermatozóides na dose inseminante que alcance o oócito em condições funcionais, e os fatores protéicos para capacitar,

penetrar e fecundar o oócito e desenvolver o embrião. A detecção destes fatores favoráveis, para manter a viabilidade e motilidade do espermatozóide, pode auxiliar na redução do número de espermatozóides para cada inseminação (GAGNON e SULLIVAN, 1999).

MARTINS *et al.* (2003), observaram que a concentração de espermatozóides recuperados da cauda do epidídimo de cães é semelhante àquelas descritas, para a espécie, no ejaculado.

Segundo GRANEMANN, *et al.*, (2006) o número total de espermatozóides colhidos da cauda dos epidídimos (direito e esquerdo), através da técnica de fluxo retrógrado, de garanhões é significativamente maior ao número total de espermatozóides colhidos com vagina artificial do mesmo. Neste mesmo experimento o autor evidenciou que o número total médio de espermatozóides dos epidídimos esquerdos foi significativamente superior aos direitos.

2.9) Tempo de viabilidade dos espermatozóides colhidos da cauda do epidídimo

MARTINEZ-PASTOR *et al.* (2005b), pesquisaram os efeitos do tempo *post mortem* (até quatro dias) sobre os espermatozóides epididimais, resfriados a 5°C, de caprinos e observaram uma boa qualidade seminal (motilidade e defeitos espermáticos) por até 72 horas, permitindo o seu uso em programas de inseminação artificial.

KAABI *et al.* (2003), estudaram os efeitos do intervalo entre a morte do animal e a recuperação dos espermatozóides da cauda do epidídimo, armazenados à temperatura ambiente e a 5°C de carneiros (0, 24 e 48 horas), sobre a qualidade e

capacidade de fertilização dos espermatozóides. Eles observaram que as amostras se mantiveram viáveis por até 24, 48 horas após a morte dos animais para os epidídimos armazenados a temperatura ambiente e resfriados respectivamente, entretanto a qualidade diminuía significativamente após esses períodos. Epidídimos armazenados a 5°C tinham melhor motilidade e menos formas anormais do que os armazenados a temperatura ambiente por mais de 24 horas. A capacidade de fertilização dos espermatozóides obtidos da cauda do epidídimo até 24 horas *post mortem* foi semelhante a do ejaculado.

MARTINEZ-PASTOR *et al.* (2005a), demonstraram os efeitos do tempo *post mortem* sobre a motilidade dos espermatozóides colhidos da cauda do epidídimo armazenados a 5°C de cervídeos e de cabritos. Observaram que muitos parâmetros são correlacionados negativamente com o tempo *post mortem*, mas a motilidade é o mais afetado, sendo que ela se manteve em níveis aceitáveis por até 48 horas.

KATO *et al.* (2002), colheram espermatozóides da cauda do epidídimo de ratos e avaliaram sua motilidade e integridade do acrossoma, 1, 3 e 5 horas, pós-orquiectomia e observaram queda significativa da motilidade após 5 horas e nenhuma alteração significativa da integridade acrossômica.

BRUEMMER *et al.* (2002), observaram que não existem diferenças significativas na motilidade de espermatozóides epididimais de garanhões, avaliados logo após a orquiectomia e 24 horas depois, desde que, o epidídimo seja mantido resfriado a 5°C.

JAMES *et al.* (2002), demonstraram que espermatozóides epididimais viáveis de garanhões podem ser colhidos por até 96 horas *post mortem*, desde que, sejam mantidos resfriados a 4°C.

2.10) Congelamento dos espermatozóides do epidídimo

O processo de congelação e descongelação pode, também, provocar danos na capacidade de motilidade e fecundação por alterações na membrana plasmática do espermatozóide (WATSON, 1995). Uma das alterações da membrana ocorre devido a lavagens ou diluições que podem remover proteínas, mudando assim a composição das amostras (HAMMERSTEDT *et al.*, 1990; COLLIN e BAILEY, 1999; RONCOLLETA *et al.*, 1999). As proteínas quando removidas podem modificar a relação dos lipídios impedindo o processo de reação acrossômica. A estabilidade de lipídios na membrana plasmática é pré-requisito para manter a função do espermatozóide (WATSON, 1995), e pode ser devido a isto, que o sêmen congelado apresenta vida fértil mais curta no trato genital da fêmea.

Os fatores epididímais, de natureza protéica são importantes: para manter a motilidade, viabilidade e habilidade dos espermatozóides congelados. Segundo LESSARD *et al.*, (1999) o sêmen fresco de bovinos apresenta uma proteína de 25 kDa cujo nível, sob o efeito de congelação, pode cair até 70% afetando a ligação espermatozóide-oócito e conseqüentemente, a taxa de fecundação.

Por outro lado, em suínos, foi observado que o espermatozóide epididimal congelado foi mais fértil do que do ejaculado congelado, mostrando ser mais resistente ao estresse da congelação (KIKUCHI *et al.*, 1998).

Espermatozóides epididímais de bovinos africanos puderam ser recuperados *post mortem* e criopreservados com sucesso. A proporção de espermatozóides viáveis e com acrossoma intacto não foi alterada nos espermatozóides criopreservados quando comparados aos colhidos no epidídimo (HERRICK *et al.*, 2004).

SOLER *et al.* (2003), demonstraram os efeitos da viabilidade e fertilidade de espermatozóides epididimais criopreservados de cervídeos, descongelados em diferentes protocolos de descongelamento (37°C por 20 segundos; 60°C por 8 segundos; 70°C por 5 segundos), observando que o primeiro protocolo de descongelamento é o mais adequado.

KIKUCHI *et al.* (1998), pesquisaram a influência do tempo *post mortem* na motilidade e capacidade de fertilização "*in vitro*" de espermatozóides epididimais de cachacos orquectomizados, sendo os espermatozóides criopreservados logo após a orquiectomia, 24, 48 e 72 horas após, sendo mantidos resfriados a 4°C, tendo como grupo controle espermatozóides ejaculados criopreservados. A motilidade dos espermatozóides criopreservados até 48 horas pós-orquiectomia não diferiu do grupo controle, já a capacidade de fertilização foi significativamente menor, com boa viabilidade nos espermatozóides criopreservados até 24 horas.

CAPÍTULO 1

**ALGUNS PARÂMETROS DE VIABILIDADE DE ESPERMATOZÓIDES EQUÍNOS
COLHIDOS POR VAGINA ARTIFICIAL E POR LAVAGEM DA CAUDA DO
EPIDÍDIMO**

*(Some viability parameters from equine spermatozoa harvested by the artificial
vagina and by epididymal tail washing)*

MURADÁS, P.R¹.; WEISS, R.R².; KOZICKI, L.E³.; GRANEMANN, L.C⁴.

¹ Mestranda do curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, UFPR;

² Departamento de Medicina Veterinária, Setor de Ciências Agrárias, UFPR;

³ Curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, UFPR;

⁴ Médico Veterinário Autônomo, UFPR;

RESUMO – Neste experimento foram utilizados 10 garanhões com o objetivo de avaliar alguns parâmetros de viabilidade de espermatozóides colhidos mediante a vagina artificial antes da orquiectomia, bem como proceder a comparação com os espermatozóides colhidos mediante lavagem da cauda epididimária, após submeter os animais à orquiectomia bilateral. Relativamente as células espermáticas constituíram-se três grupos: 1. o colhido com vagina artificial (VA); 2. o colhido do epidídimo esquerdo; 3. e o colhido do epidídimo direito. Os parâmetros pesquisados para a avaliação da viabilidade espermática à temperatura ambiente (cerca de 22 graus C) foram: teste de resistência a 5°C do sêmen colhido com vagina artificial (grupo 1), motilidade total, motilidade progressiva, vigor e patologias de acrossoma (todos os grupos). Os seguintes resultados foram obtidos: a motilidade total, motilidade progressiva e vigor dos espermatozóides colhidos com VA diferiram ($p < 0,05$) dos colhidos dos epidídimos; estes mesmos parâmetros não apresentaram diferença entre os epidídimos direito e esquerdo. Os defeitos de acrossoma dos espermatozóides não apresentaram diferença significativa entre os grupos.

Palavras-chave: epidídimo, espermatozóides, orquiectomia, garanhão, sêmen.

ABSTRACT In this experiment 10 sires with the objective had been used to evaluate some parameters of viability of spermatozoa harvested by means of the artificial vagina before the orchiectomy, as well as proceeding the comparison with the spermatozoa harvested by means of laudering from the epididymis tail, after to submit the animals to the bilateral orchiectomy. Relatively the spermatid cells had consisted three groups: the 1. harvested one with artificial vagina (VA); 2. the harvested one of epididymis left; 3. and the harvested one of epididymis right. The parameters searched for the evaluation of the spermatid viability to the ambient temperature (about 22 degrees C) had been: resistance test 5°C of the semen harvested with artificial vagina (group 1), total motility, gradual motility, vigor and pathologies of acrosoma (all the groups). The following results had been gotten: the total motility, gradual motility and vigor of the spermatozoa harvested with VA had differed ($p < 0,05$) from the harvested ones of epididymis them; these same parameters had not presented difference between epididymis them right and left. The defects of acrosoma of the spermatozoa had not presented significant difference between the groups.

Key-words: epididymis, spermatozoa, orchiectomy, sire, semen.

INTRODUÇÃO

O reprodutor, como um dos fatores imprescindíveis na cadeia da produção animal, deve apresentar eficiente potencial de fertilidade “*in vitro*” e “*in vivo*”, variando de indivíduo para indivíduo em função da qualidade do sêmen (BELLIN *et al.*, 1998).

A recuperação de espermatozóides da cauda do epidídimo é uma técnica importante para se preservar reservas genéticas de animais valiosos recém mortos. Os espermatozóides, para realizarem a função de fecundar o oócito, devem se apresentar morfológica e funcionalmente normais, características originadas no testículo, quando da espermatogênese, em curso (NISHIMUNE e OKABE, 1993), e completados na passagem pelo epidídimo (maturação) e no contato com as secreções das glândulas anexas.

Nos mamíferos, o epidídimo possui diversas funções, ressaltando-se a reabsorção dos fluídos dos túbulos seminíferos, promovendo a concentração do sêmen, o transporte dos espermatozóides, a eliminação dos espermatozóides defeituosos, a maturação e o armazenamento dos espermatozóides. A função de armazenamento é ilustrada pelo fato dos espermatozóides ejaculados sobreviverem por 24 horas ou mais fora do epidídimo; entretanto os que são mantidos na cauda do epidídimo (*in vivo*) permanecem vivos por mais de 15 dias. Esta funcionalidade é baseada na manutenção do metabolismo com baixa atividade, prevenindo a ativação prematura dos espermatozóides; durante o período de armazenamento o epidídimo acumula espermatozóides suficientes para a cópula. O volume da cauda do epidídimo reflete a capacidade de armazenamento de espermatozóides do macho. Em touros e garanhões o número de espermatozóides armazenados na cauda do epidídimo pode ser suficiente para até 10 ejaculações sucessivas

dependendo da idade, tamanho e atividade reprodutiva do animal (BEDFORD, 1994).

Com o incremento da inseminação artificial (IA) em eqüinos, o processo de diluição, criopreservação e descongelamento do sêmen, em presença ou não do plasma seminal, pode-se minimizar as perdas de material genético, quando um reprodutor de significativo valor genético for a óbito e dele não se possuir material genético anteriormente criopreservado (MAXWELL e JOHNSON, 2000).

Em função da possibilidade de ocorrer morte súbita de reprodutores valiosos de qualquer espécie e antevendo-se a colheita da última possível fração de espermatozoides,

Objetivou-se neste experimento, avaliar a durabilidade da fertilidade de espermatozoides obtidos da cauda do epidídimo, bem como as diferenças relativas aos parâmetros de viabilidade de espermatozóides colhidos mediante a vagina artificial antes da orquiectomia e os espermatozóides colhidos mediante lavagem da cauda epididimária após a orquiectomia, mantidos à temperatura ambiente (cerca de 22° C).

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados 10 garanhões totalizando 19 epidídimos, (um dos garanhões era criptorquida unilateral), com idade entre 24 e 90 meses, sendo um da raça Lusitana, dois da Pônei, dois da Crioula, dois mestiços com Puro Sangue Inglês, dois da Apaloosa e um da Mangalarga, oriundos de criatórios de Curitiba e Região Metropolitana. Os animais utilizados no experimento foram alojados no Hospital

Veterinário da Universidade Federal do Paraná, em baias individuais e alimentados com concentrado comercial contendo 13% de proteína bruta, 10% de fibras totais, 1,5% de Ca e 0,5% de P, feno de *Coast Cross* e água *ad libitum* durante todo o experimento.

Colheita de sêmen com vagina artificial

A colheita de sêmen foi realizada semanalmente, com vagina artificial modelo Hannover, sendo realizada no mínimo duas colheitas de cada garanhão antes da orquiectomia.

Teste de resistência a 5°C

Logo após a colheita procedeu-se a uma diluição inicial do sêmen com diluente comercial (Botu-Crio®), à base de 1:1 foi submetido ao teste de resistência a 5°C. Durante o teste de resistência foram feitas avaliações de motilidade total, motilidade progressiva e vigor a cada 6 horas e os esfregaços para a avaliação dos defeitos de acrossoma, eram repetidos a cada 24 horas. Este teste da resistência espermática a 5° C foi executado, para verificar se os animais do experimento encaixavam-se dentro dos parâmetros aceitáveis de viabilidade.

Colheita dos espermatozoides da cauda dos epidídimos

Os epidídimos foram obtidos uma semana após a última colheita de sêmen com a vagina artificial, quando os garanhões foram submetidos à orquiectomia bilateral. Os epidídimos após a orquiectomia eram mantidos a temperatura ambiente de cerca de 22° C até o início da avaliação dos espermatozoides.

A técnica de colheita dos espermatozoides da cauda do epidídimo baseou-se nos relatos de GARDE *et al.* (1994), com modificações e realizada da seguinte maneira: o complexo testículo-epidídimo foi separado em duas partes: testículo e cauda do epidídimo, sendo feita uma lavagem externa da cauda do epidídimo com soro fisiológico pré-aquecido (37°C), para remoção do sangue. O tecido conjuntivo que recobre a cauda do epidídimo foi removido por dissecação cuidadosa evitando-se o rompimento dos vasos sanguíneos e do ducto epididimário. Após a remoção dos tecidos, foram desfeitos os contornos do ducto epididimário, que formavam a cauda do mesmo. Em seguida, o ducto epididimário foi segmentado em três partes para facilitar a lavagem e a colheita dos espermatozoides, tendo cada segmento de 20 a 40 centímetros, dependendo do tamanho da cauda do epidídimo. Para realização da lavagem, as duas extremidades do segmento eram pinçadas (pinças de Kelly) a fim de evitar o extravasamento dos espermatozoides. Na seqüência o segmento era mantido em posição vertical, sobre um filtro acoplado a um copo coletor pré-aquecido (37°C); em seguida retirava-se a pinça da extremidade inferior e injetava-se o diluente no lúmen do mesmo, com auxílio de uma seringa e agulha (0,45 X 13), imediatamente abaixo da pinça superior remanescente, fazendo com que os espermatozoides fossem carregados pelo diluente e recuperados na outra extremidade.

A lavagem de cada cauda epididimária foi feita com 10 mL do diluente pré-aquecido a 37°C. Após o término da lavagem, os espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo foram submetidos ao mesmo processo a que foram submetidos os colhidos com a vagina artificial para avaliação dos parâmetros de viabilidade espermática, à exceção do teste de resistência a 5° C, conforme justificado acima.

Parâmetros de avaliação da viabilidade espermática

Após a colheita com a vagina artificial, durante o teste de resistência a 5°C e após a lavagem luminal dos ductos da cauda do epidídimo, os espermatozóides foram avaliados colocando-se uma gota do complexo sêmen mais diluente em uma lâmina de vidro e coberta por uma lamínula, pré-aquecidas a 37°C, para avaliação da motilidade total e motilidade progressiva dos espermatozóides, realizada em microscopia óptica¹, em aumento de 200 vezes, e registrada em dados percentuais. A determinação da intensidade do movimento dos espermatozóides (vigor) foi também realizada em microscopia óptica, em aumento de 200 vezes, atribuindo-se escala de 0 a 5, entre os valores mínimos e máximos observados, respectivamente segundo critérios propostos pelo COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL (1998).

Para avaliação da integridade de acrossoma foram feitos esfregaços com os espermatozóides diluídos tanto do sêmen colhido com a vagina artificial quanto dos espermatozóides colhidos da cauda dos epidídimos. Os esfregaços foram corados com vermelho congo e violeta de genciana como descrito por CEROVSKY (1976), e a porcentagem dos defeitos de acrossoma (destacado, em destacamento, rugoso, heterogêneo dentre outros), foi obtida pela contagem de 100 células espermáticas em microscópio de contraste de fase² em objetiva de imersão.

O resultados foram submetidos ao tratamento estatístico do teste de Fisher ao nível de 5%.

¹ Olympus – BH-2 – Japão.

² Olympus-BX41TF – Japão

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a colheita do sêmen com a vagina artificial, o mesmo foi diluído e submetido ao teste de resistência a 5°C, para se avaliar o decréscimo da viabilidade espermática ao longo do tempo como demonstra a TABELA 1. A linha tracejada demonstra que estes animais apresentavam viabilidade aceitável de até 42 horas pós colheita, ou seja motilidade progressiva acima de 30%. Após alcançarem este mínimo, foram submetidos a orquiectomia sete dias após a última colheita de sêmen.

TABELA 1 - COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DE MOTILIDADE TOTAL, MOTILIDADE PROGRESSIVA E VIGOR DOS ESPERMATOZÓIDES COLHIDOS COM VAGINA ARTIFICIAL RELATIVAMENTE AO TEMPO NO TESTE DE RESISTÊNCIA A 5°C (n=10) 2006.

Horas pós-início do teste de resistência a 5°C	Média da Motilidade Total dos Espermatozóides (%)	Média da Motilidade Progressiva dos Espermatozóides (%)	Média do Vigor dos Espermatozóides (escala de 0 a 5)
6	78,5 ^a	62 ^a	4,5 ^a
12	73 ^{ab}	57,5 ^{ab}	3,9 ^{ab}
18	68 ^{abc}	50 ^{bc}	3,5 ^{bc}
24	63 ^{abcd}	43,5 ^{cd}	2,9 ^{cd}
30	61 ^{bcd}	40 ^{cde}	2,7 ^{cde}
36	57,5 ^{bcd}	36,5 ^{de}	2,5 ^{de}
42	54,5 ^{cde}	33,5 ^{def}	2,2 ^{def}
48	50,5 ^{de}	29,5 ^{efg}	1,9 ^{efg}
54	41,5 ^{ef}	23 ^{fgh}	1,6 ^{fg}
60	39 ^{ef}	19,5 ^{ghi}	1,4 ^{fgh}
66	29 ^{fg}	14,5 ^{hij}	1,2 ^{ghi}
72	23 ^{gh}	11 ^{ij}	1,1 ^{ghi}
78	17,5 ^{gh}	9,5 ^{ij}	0,7 ^{hi}
84	17,5 ^{gh}	9 ^{ij}	0,7 ^{hi}
90	12,5 ^h	7 ^j	0,5 ⁱ
96	12 ^h	6,5 ^j	0,5 ⁱ

^{a b c d e f g h i j} Letras diferentes na mesma coluna indicam que os valores diferem entre si pelo teste Fisher ($p < 0,05$).

Linha tracejada indica o limite de tempo de viabilidade espermática de 42 horas.

Na TABELA 2 observa-se que os valores de motilidade total, motilidade progressiva e vigor dos espermatozóides colhidos com vagina artificial diferem

significativamente dos valores dos epidídimos esquerdo e direito, porém entre os dois epidídimos, não houve diferenças. SILVA *et al.* (2003), comparando o sêmen em ejaculado e espermatozóides colhidos da cauda do epidídimo de touros nelore, observaram que a motilidade total dos espermatozóides do ejaculado era significativamente maior do que a do epidídimo, corroborando os resultados deste experimento.

TABELA 2 – COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DE MOTILIDADE TOTAL, MOTILIDADE PROGRESSIVA E VIGOR DOS ESPERMATOZÓIDES ENTRE OS GRUPOS DE ESPERMATOZÓIDES DE EQUÍNOS COLHIDOS COM VAGINA ARTIFICIAL, COM LAVADO DO EPIDÍDIMO ESQUERDO E DIREITO (2006).

Grupos	N	Média da Motilidade Total dos Espermatozóides (%)	Média da Motilidade Progressiva dos Espermatozóides (%)	Média do Vigor dos Espermatozóides (escala 0 a 5)	Patologias de Acrossoma (%)
Vagina Artificial	10	73 ^a	58 ^a	4,4 ^a	7,60 ^a
Epidídimo Esquerdo	10	45,7 ^b	32 ^b	2 ^b	10,40 ^a
Epidídimo Direito	9	38,33 ^b	21,89 ^b	1,67 ^b	7,11 ^a

^{a b} Letras diferentes na mesma coluna indicam que os valores diferem entre si pelo teste Fisher ($p < 0,05$).

Os percentuais de defeitos de acrossoma, como pode ser observado na TABELA 2, não apresentaram diferença entre os três grupos. BRIZ *et al.* (1996) verificaram as malformações espermáticas em diferentes regiões do epidídimo (cabeça, corpo e cauda) de reprodutores suínos sexualmente maduros a fim de determinar a origem das mesmas e observaram diferenças entre a frequência de alguns tipos de defeitos e a região de origem no epidídimo. Outros defeitos eram distribuídos uniformemente ao longo do epidídimo. Segundo os autores supracitados os defeitos de origem secundária aumentam na cauda do epidídimo, e os de origem primária, com exceção da cauda dobrada, são constantes ao longo do epidídimo.

Existe uma relação entre o percentual de motilidade progressiva dos espermatozoides colhidos da cauda do epidídimo e as horas pós-orquiectomia, como é observado no QUADRO 1.

QUADRO 1 - PERCENTUAL DA MOTILIDADE TOTAL, MOTILIDADE PROGRESSIVA E VIGOR DOS ESPERMATOZÓIDES COLHIDOS DA CAUDA DO EPIDÍDIMO E MANTIDOS À TEMPERATURA AMBIENTE, EM RELAÇÃO ÀS HORAS PÓS-ORQUIECTOMIA (2006). (n=19)

ANIMAIS	Horas "pós-orquiectomia"	Motilidade Total (%)	Motilidade Progressiva (%)	Vigor (escala de 0 a 5)
1 (EE)	1	70	40	2
1 (ED)	2	40	20	2
2 (ED)	3	5	2	1
2 (EE)	4	65	60	3
3 (EE)	5	80	70	3
3 (ED)	6	60	20	1
4 (ED)	7	85	70	4
4 (EE)	10	80	60	4
5 (EE)	12	75	50	1
6 (ED)	14	30	20	2
6 (EE)	16	30	10	2
7 (ED)	18	60	40	2
7 (EE)	20	50	30	2
8 (ED)	22	20	5	1
9 (ED)	24	40	20	1
10 (ED)	24	5	0	1
8 (EE)	26	5	0	1
9 (EE)	36	1	0	1
10 (EE)	36	1	0	1

EE = Epidídimo Esquerdo;
ED = Epidídimo Direito.

O epidídimo direito do animal número dois apresentou valores baixos de motilidade total, motilidade progressiva e vigor devido ao pouco tempo de descida do testículo direito da cavidade abdominal. Este animal possuía 24 meses de idade e estava em fase de desenvolvimento sexual.

No momento da colheita de espermatozoides dos epidídimos, estes apresentavam-se imóveis, porém ocorria a melhoria da motilidade e vigor, após uma

hora em contato com o diluente. Este fato é atribuído a que, quando as células espermáticas são recuperadas deste modo, elas estão concentradas e na ausência dos fluidos das glândulas acessórias. Segundo pesquisadores o plasma seminal tem funções de transporte, sustentação e motilidade inicial das células espermáticas após a ejaculação além de aumentar a longevidade dos espermatozóides (TIPLADY *et al.*, 2002). KATILA *et al.* (2002), demonstraram que os espermatozóides eqüinos colhidos da cauda do epidídimo apresentavam melhoria na motilidade total, progressiva e no vigor, 15 minutos após a adição de plasma seminal, função esta realizada, no presente experimento, pelo diluente Botu-Crio®, ao proporcionar um meio nutritivo adequado, ativando os espermatozóides.

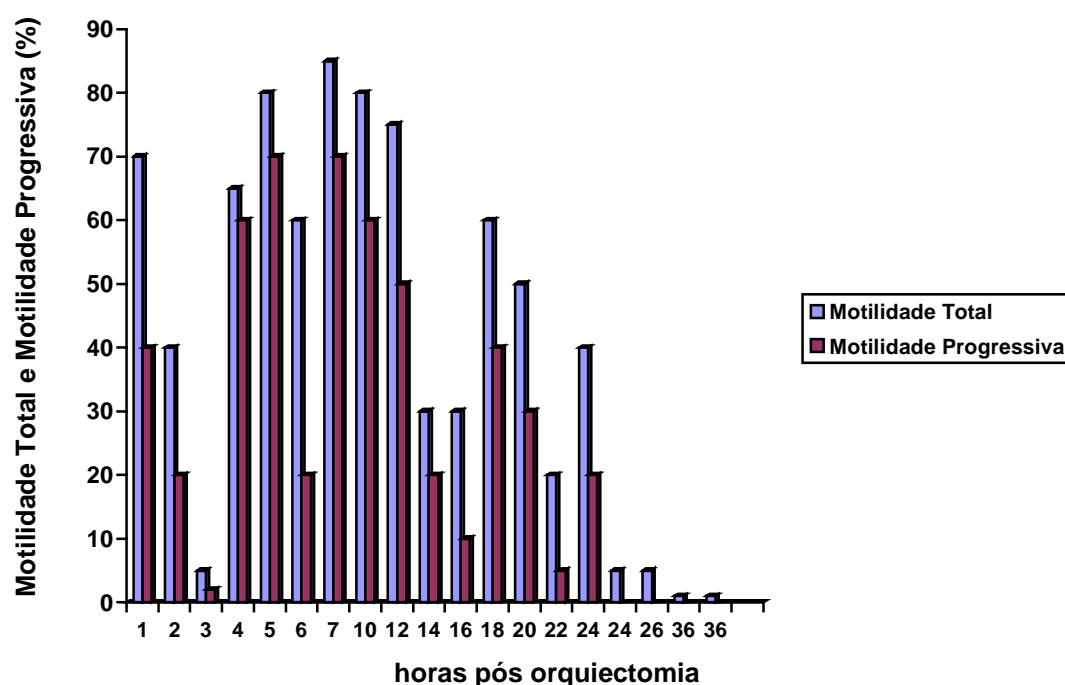
Os valores de motilidade total, motilidade progressiva e vigor dos espermatozóides epididimários até 24 horas pós-orquiectomia, obtidos nesse experimento, foram semelhantes aos da vagina artificial. Resultados similares foram obtidos por BRUEMMER *et al.* (2002), JAMES *et al.* (2002), KATILA *et al.* (2002) e TIPLADY *et al.* (2002), ao trabalharem com espermatozóides recuperados de epidídimos eqüinos armazenados a 4°C.

Como esperado, observou-se um declínio da qualidade espermática com o aumento do tempo pós-orquiectomia (GRAFICO 1), tendo-se como limite de viabilidade, próximo das 24 horas. Este decréscimo não é devido somente ao envelhecimento e esgotamento metabólico dos espermatozóides, mas também é inerente ao processo de degeneração tecidual pós-orquiectomia.

Pesquisadores ao trabalharem com outras espécies animais, como CHRISTIAN *et al.* (1993) e KISHIKAWA *et al.* (1999) em ratos, GARDE *et al.* (1994) em caprinos, KAABI *et al.* (2003) em ovinos, demonstraram que espermatozóides epididimários viáveis podem ser recuperados de epidídimos armazenados à

temperatura ambiente por até 24 horas, corroborando os valores encontrados no presente experimento, executado em equinos.

GRÁFICO 1 - RELAÇÃO ENTRE O PERCENTUAL DE MOTILIDADE TOTAL E MOTILIDADE PROGRESSIVA DOS ESPERMATOZÓIDES COLHIDOS DA CAUDA DO EPIDÍDIMO (DIREITO E ESQUERDO) À TEMPERATURA AMBIENTE E AS HORAS PÓS-ORQUIECTOMIA (2006).



De todos os epidídimos após as 24 horas obteve-se espermatozóides com qualidade significativamente inferior ao obtido com os colhidos com a vagina artificial. SONSASEN *et al.* (1998), trabalhando com ratos demonstraram que as degenerações dos túbulos epididimários começam a afetar os espermatozóides epididimários, próximo das 24 horas *post-mortem*, tempo condizente com os valores encontrados neste experimento, pois a partir das 24 horas ocorreu diminuição acentuada da qualidade das células espermáticas epididimárias.

O limite de 24 horas para a colheita de espermatozóides de epidídimos armazenados à temperatura ambiente com motilidade e vigor semelhantes ao da

vagina artificial verificado nesse experimento, é bastante inferior ao encontrado por JAMES *et al.* (2002) em garanhões, GARDE *et al.* (1998) em cervídeos, SANKAI *et al.* (2001) em ratos e YU e LEIBO (2002) em cães, ao recuperarem espermatozóides epididimários viáveis por até 96 horas pós-orquiectomia. Estes valores são muito superiores aos encontrados no presente experimento, porque eles mantiveram os epidídimos refrigerados a 5°C após a orquiectomia. A temperatura mais baixa retarda o processo de degeneração e reduz o metabolismo dos espermatozóides, mantendo-os vivos por mais tempo (JAMES *et al.*, 2002).

CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos nesse experimento conclui-se que:

- a) Os espermatozóides colhidos da cauda de epidídimos e mantidos à temperatura ambiente foram considerados viáveis por até 24 horas pós-orquiectomia.
- b) Motilidade total, motilidade progressiva e vigor dos espermatozóides colhidos com a vagina artificial, antes da orquiectomia, diferem ($p < 0,05$) dos espermatozóides colhidos dos epidídimos pós-orquiectomia; entretanto esses mesmos parâmetros não diferiram entre os epidídimos direito e esquerdo;
- c) Os defeitos de acrossoma dos espermatozóides não apresentaram diferença significativa entre os três grupos;

CAPÍTULO 2

**TESTE DE CRIOPRESERVAÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES COLHIDOS DA
CAUDA DO EPIDÍDIMO DE EQUÍNOS ORQUIECTOMIZADOS**
*(Freezing test of the harvested spermatozoa of the tail of orchiectomized equine
epididymis)*

**MURADÁS, P.R.¹.; WEISS, R.R.².; KOZICKI, L.E.³.; GRANEMANN, L.C.⁴.; TREML,
T.E.; RIBAS, N.J.B.N.⁵**

¹ Mestranda do curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, UFPR;

² Departamento de Medicina Veterinária, Setor de Ciências Agrárias, UFPR;

³ Curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, UFPR;

⁴ Médico Veterinário Autônomo, UFPR;

⁵ Aluno de Graduação do Curso de Medicina Veterinária da PUC-PR;

RESUMO – Neste experimento foram utilizados 10 garanhões com o objetivo de se comparar à resistência ao teste de criopreservação de espermatozóides epididimais. Os animais foram submetidos à orquiectomia bilateral e seus epidídimos foram conservados a temperatura ambiente até o momento da colheita dos espermatozóides da cauda epididimária. Foram estabelecidos três grupos: 1. o colhido com vagina artificial (VA); 2. o colhido do epidídimo esquerdo; 3. e o colhido do epidídimo direito. Os parâmetros considerados para a avaliação da viabilidade espermática foram: motilidade total, motilidade progressiva, vigor e integridade de acrossoma. Como resultados obteve-se que a motilidade total, motilidade progressiva e os defeitos de acrossoma dos espermatozóides pós-descongelamento não diferiram ($p < 0,05$) entre os três grupos; porém o vigor dos espermatozóides colhidos com a vagina artificial foi significativamente superior. A motilidade progressiva dos espermatozóides recém colhidos, independentemente do grupo a que pertenciam foi significativamente maior do que a dos espermatozóides pós descongelamento.

Palavras-chave: espermatozóides, garanhão, epidídimo, congelamento.

ABSTRACT – In this experiment 10 sires with the objective of if comparing with the resistance to the test of freezing of epididymis spermatozoa had been used. The animals had been submitted to the bilateral orchiectomy and it we epididymis had been conserved the ambient temperature until the moment of the harvest of the spermatozoa of the epididymis tail. Three groups had been established: the 1. harvested one with artificial vagina (VA); 2. the harvested one of epididymis left; 3. and the harvested one of epididymis right. The parameters considered for the evaluation of the spermatoc viability had been: motility, gradual motility, vigor and integrity of acrosoma. As results were gotten that the total motility, gradual motility and the defects of acrosoma of the spermatozoa after-unfreeze had not differed ($p < 0,05$) between the three groups; however the vigor of the spermatozoa harvested with the artificial vagina was significantly superior. The gradual motility of the spermatozoa just harvested, independently of the group the one that belonged was significantly bigger of what of the spermatozoa after unfreeze.

Key-words: spermatozoa, sire, epididymis, freezing.

INTRODUÇÃO

A recuperação de espermatozóides viáveis do epidídimo *post mortem* é uma técnica importante para se obter reservas genéticas de animais valiosos e ameaçados de extinção.

Com o incremento da inseminação artificial (IA) em eqüinos, o processo de diluição, criopreservação e descongelamento do sêmen, em presença ou não de plasma seminal, pode-se minimizar as perdas de material genético quando um animal de grande valor genético for a óbito e dele não se ter material genético anteriormente criopreservado (MAXWELL e JOHNSON, 2000).

O processo de congelação e descongelação pode, provocar danos na capacidade de motilidade e fecundação por alterações na membrana plasmática do espermatozóide (WATSON, 1995). Uma das alterações da membrana ocorre devido à lavagens ou diluições que podem remover proteínas, transformando assim a composição das amostras (HAMMERSTEDT et al., 1990; COLLIN e BAILEY, 1999; RONCOLLETA et al., 1999). As proteínas quando removidas podem modificar a relação dos lipídios impedindo o processo de reação acrossômica. A estabilidade de lipídios na membrana plasmática é pré-requisito para manter a função do espermatozóide (WATSON, 1995), e pode ser devido a isto, que o sêmen congelado apresenta vida fértil mais curta no trato genital da fêmea.

Os objetivos deste experimento foram: avaliar a existência de diferença nos parâmetros de viabilidade das células espermáticas pós-descongelamento entre os três grupos; e comparar a motilidade progressiva entre os espermatozóides recém colhidos e os pós-descongelamento.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados 10 garanhões totalizando 19 epidídimos, pois um dos garanhões era criptorquida, com idade entre 24 e 90 meses, sendo um da raça Lusitana, dois Pôneis, dois da raça Crioula, dois mestiços com Puro Sangue Inglês, dois Apaloosas e um Mangalarga, oriundos de criatórios de Curitiba e Região Metropolitana. Os animais utilizados no experimento foram alojados no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná, em baias individuais e alimentados com concentrado comercial contendo 13% de proteína bruta, 10% de fibras totais, 1,5% de Ca e 0,5% de P, feno de *Coast Cross* e água *ad libitum* durante todo o experimento.

Colheita de Sêmen com Vagina Artificial

A colheita de sêmen foi realizada semanalmente, com vagina artificial modelo Hannover, sendo realizadas duas colheitas de cada garanhão antes da orquiectomia.

Colheita dos espermatozoides da cauda dos epidídimos

Os epidídimos foram obtidos uma semana após a última colheita de sêmen utilizando-se a vagina artificial, quando os garanhões foram submetidos à orquiectomia bilateral.

A técnica de colheita dos espermatozoides da cauda do epidídimo foi realizada segundo descrito por GRANEMANN et.al. (2006), da seguinte maneira: o complexo testículo-epidídimo foi separado em duas partes, testículo e cauda do

epidídimo, sendo feita uma lavagem da cauda do epidídimo com soro fisiológico pré-aquecido (37°C), para remoção do sangue. O tecido conjuntivo que recobre a cauda do epidídimo foi removido por dissecação cuidadosa para se evitar o rompimento dos vasos sanguíneos e do ducto epididimário.

Após a remoção dos tecidos, foram desfeitos os contornos do ducto epididimário, que formam a cauda do mesmo. Em seguida, o ducto epididimário foi segmentado em três partes para facilitar a lavagem e a colheita dos espermatozóides, tendo cada segmento de 20 a 40 centímetros, dependendo do tamanho da cauda do epidídimo. Para realização da lavagem, uma das extremidades do segmento foi pinçada, para evitar o extravasamento dos espermatozóides, mantendo o segmento estendido na posição vertical, sobre um filtro acoplado a um copo coletor pré-aquecido (37°C), sendo o diluente injetado no lúmen do mesmo, com auxílio de uma seringa e agulha (0,45 X 13), imediatamente abaixo do local pinçado, fazendo com que os espermatozóides fossem carreados pelo diluente e recuperados na outra extremidade.

A lavagem epididimária foi feita com o diluente Botu-Crio®, pré-aquecido a 37°C. Para lavagem de cada cauda do epidídimo foram utilizados 10 mL de diluente, divididos entre os três segmentos. Após o término da lavagem, os espermatozóides recuperados da cauda do epidídimo (dos três segmentos misturados) foram submetidos ao mesmo processo a que foram submetidos os colhidos com a vagina artificial para avaliação dos parâmetros de viabilidade espermática.

Parâmetros de avaliação da viabilidade espermática

Os espermatozóides pré e pós-congelamento foram avaliados colocando-se uma gota do complexo sêmen mais diluente em uma lâmina e coberta por uma

lamínula, de vidro, pré-aquecidas a 37°C, para avaliação da motilidade e motilidade progressiva dos espermatozóides, realizada em microscopia óptica³, em aumento de 200 vezes, e registrada em dados percentuais. A determinação da intensidade do movimento dos espermatozóides (vigor) foi também realizada em microscopia óptica, em aumento de 200 vezes, atribuindo-se escala de 0 a 5, entre os valores mínimos e máximos observados, respectivamente (COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 1998).

Para avaliação da integridade de acrossoma foram feitos esfregaços delgados com os espermatozóides diluídos tanto do sêmen colhido com vagina artificial quanto dos espermatozóides da cauda dos epidídimos. Os esfregaços foram corados com corante de CEROVSKY (1976) e a porcentagem, dos acrossomas não íntegros, foi obtida pela contagem de 100 células espermáticas em microscópio de contraste de fase⁴ em objetiva de imersão.

O resultados foram submetidos ao tratamento estatístico do teste de Fisher ao nível de 5%.

Congelamento dos espermatozóides

Nos três grupos o processo de congelamento dos espermatozóides foi o mesmo. Após uma hora da colheita, tempo este padrão para os três grupos, os espermatozóides diluídos com Botu-Crio®, foram envasados e identificados em palhetas de 0,5ml. Após o envasamento as palhetas permaneceram 20 minutos à temperatura de 5°C, em seguida as palhetas sofreram um pré congelamento no vapor de nitrogênio à temperatura de -120°C por 15 minutos e em seguida as

³ Olympus – BH-2 – Japão.

⁴ Olympus-BX41TF – Japão

palhetas foram armazenadas em nitrogênio líquido a -196°C no mínimo durante 24 horas antes do descongelamento.

O descongelamento foi efetuado em banho-maria à temperatura de 37°C por 30 segundos. Após o descongelamento os parâmetros de viabilidade (motilidade total, motilidade progressiva, vigor, patologias de acrossoma) dos espermatozóides foram imediatamente avaliados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A TABELA 1 demonstra os parâmetros dos espermatozóides antes do congelamento. Observa-se que os valores de motilidade total, motilidade progressiva e vigor dos espermatozóides colhidos com vagina artificial diferem significativamente dos valores dos epidídimos esquerdo e direito. Já entre os dois epidídimos, não há diferença. SILVA *et al.* (2003), comparando o sêmen em ejaculado e espermatozóides colhidos da cauda do epidídimo de touros nelore, observaram que a motilidade total dos espermatozóides do ejaculado era significativamente maior do que a do epidídimo, corroborando os resultados deste experimento.

TABELA 1 – COMPARAÇÃO DA MOTILIDADE TOTAL, MOTILIDADE PROGRESSIVA E VIGOR DE ESPERMATOZÓIDES EQUÍNOS COLHIDOS COM VAGINA ARTIFICIAL, DO EPIDÍDIMO ESQUERDO E DO EPIDÍDIMO DIREITO (2006).

Grupos	N	Média da Motilidade Total dos Espermatozóides (%)	Média da Motilidade Progressiva dos Espermatozóides (%)	Média do Vigor dos Espermatozóides (escala de 0 a 5)	Defeitos de Acrossoma (%)
Vagina Artificial	10	73 ^a	58 ^a	4,4 ^a	7,60 ^a
Epidídimo Esquerdo	10	45,7 ^b	32 ^b	2 ^b	10,40 ^a
Epidídimo Direito	9	38,33 ^b	21,89 ^b	1,67 ^b	7,11 ^a

^{a b} Letras diferentes na mesma coluna indicam que os valores diferem entre si pelo teste Fisher ($p < 0,05$).

Os percentuais de defeitos de acrossoma (observados na TABELA 1) não apresentaram diferença entre os três grupos. BRIZ *et al.* (1996) ao trabalharem com reprodutores suínos, verificaram as malformações espermáticas em diferentes regiões do epidídimo considerando-se a cabeça, corpo e cauda.

Segundo MURADÁS *et al.* (2006) não encontraram diferença significativa entre os parâmetros de avaliação espermática, motilidade total, motilidade progressiva, e vigor dos espermatozóides epididimários de eqüinos até 24 horas pós-orquiectomia, o que corrobora com os dados encontrados neste experimento.

Na TABELA 2 observa-se que os parâmetros de viabilidade espermática após o descongelamento dos três grupos não diferem significativamente entre si, porém o vigor, dos espermatozóides colhidos com vagina artificial, difere significativamente dos valores dos epidídimos esquerdo e direito, entretanto, entre os dois epidídimos, não há diferença significativa.

TABELA 2 – COMPARAÇÃO DA MOTILIDADE TOTAL, MOTILIDADE PROGRESSIVA E VIGOR DOS ESPERMATOZÓIDES EQUÍNOS PÓS-DESCONGELAMENTO ENTRE OS GRUPOS DE ESPERMATOZÓIDES COLHIDOS COM VAGINA ARTIFICIAL, DO EPIDÍDIMO ESQUERDO E DO EPIDÍDIMO DIREITO (2006).

Grupos	N	Média da Motilidade Total dos Espermatozóides (%)	Média da Motilidade Progressiva dos Espermatozóides (%)	Média do Vigor dos Espermatozóides (escala de 0 a 5)	Patologias de Acrossoma (%)
Vagina Artificial	10	38,50 ^a	25,50 ^a	3,2 ^a	16,90 ^a
Epidídimo Esquerdo	10	27,50 ^a	18,00 ^a	1,5 ^b	17,00 ^a
Epidídimo Direito	9	21,67 ^a	12,22 ^a	1,56 ^b	18,00 ^a

^{a b} Letras diferentes na mesma coluna indicam que os valores diferem entre si pelo teste Fisher ($p < 0,05$).

HERRICK *et al.* (2004), trabalhando com bovinos africanos relataram que espermatozóides epididimais podem ser recuperados pós-morte e criopreservados com sucesso. Estes autores encontraram ainda que a proporção de espermatozóides viáveis e com acrossoma intacto não foi alterada nos espermatozóides criopreservados quando comparados aos colhidos no epidídimo, corroborando com os resultados obtidos nesse experimento. Por outro lado BLASH *et al.* (2000), trabalharam com caprinos e não só demonstraram que os espermatozóides epididimais podem ser recuperados pós-morte e criopreservados com sucesso bem como apresentam valores superiores de integridade de acrossoma, porcentagem de espermatozóides vivos, maior capacidade de fecundação “*in vivo*” e “*in vitro*”, quando comparados aos espermatozóides colhidos do ejaculado. Estes resultados encontrados por BLASH *et al* (2000), não refletem a realidade deste experimento, apesar de não haver diferença significativa de motilidade total, motilidade e defeitos de acrossoma entre os três grupos aqui estudados, os espermatozóides colhidos do ejaculado apresentaram todos os parâmetros de avaliação superiores quando comparados aos dos epidídimos.

KIKUCHI *et al* (1998), ao trabalharem com suínos observaram que espermatozóides epididimais congelados foram mais férteis do que espermatozóides de ejaculados congelados, mostrando serem mais resistente ao estresse da congelação, resultados que corroboram com o trabalho de BLASH *et al* (2000).

Dados do GRAFICO 1 e a TABELA 3 demonstram que a motilidade progressiva é superior nos espermatozóides recém colhidos com vagina artificial. Em contraposição nos três grupos de espermatozóides descongelados, obteve-se média de motilidade progressiva inferior a 30%, o que confere inadequação para a inseminação artificial na espécie eqüina.

GRÁFICO 1 – COMPARAÇÃO DO PERCENTUAL DA MOTILIDADE PROGRESSIVA DOS ESPERMATOZÓIDES RECÉM COLHIDOS E DESCONGELADOS DO GRUPO DA VAGINA ARTIFICIAL, DO EPIDÍDIMO ESQUERDO E DO DIREITO (2006)

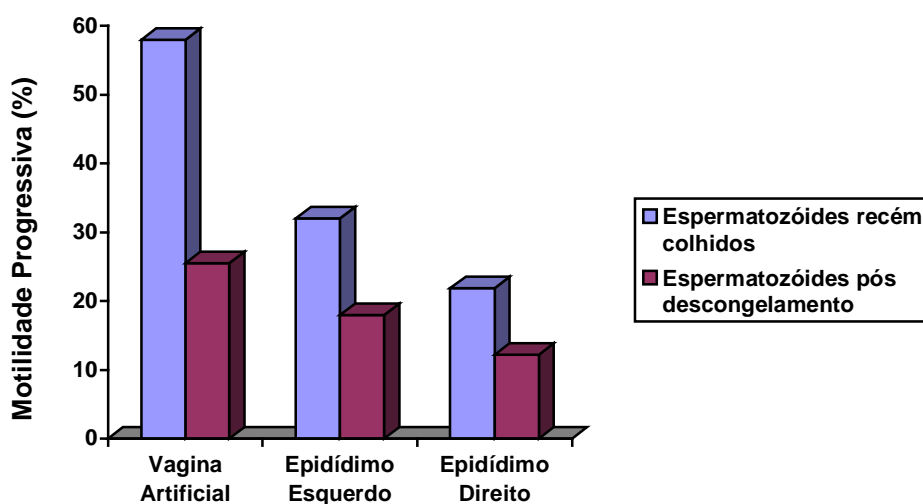


TABELA 3 – COMPARAÇÃO DO PERCENTUAL DA MOTILIDADE PROGRESSIVA DOS ESPERMATOZÓIDES RECÉM COLHIDOS E PÓS-DESCONGELADOS DO GRUPO DA VAGINA ARTIFICIAL, DO EPIDÍDIMO ESQUERDO E DO DIREITO (2006)

Grupos	n	Média da Motilidade Progressiva dos Espermatozoides pós colheita (%)	Média da Motilidade Progressiva dos Espermatozoides pós-descongelamento (%)
Vagina Artificial	10	58 ^a	25,50 ^b
Epidídimo Esquerdo	10	32 ^a	18,00 ^b
Epidídimo Direito	9	21,89 ^a	12,22 ^b

^{a b} Letras diferentes na mesma linha indicam que os valores diferem entre si pelo teste Fisher ($p < 0,05$).

Na presente pesquisa houve significativa queda (TABELA 3) da motilidade progressiva de espermatozoides pós-descongelamento corroborando com dados de NIZAN'SKI *et al* (2005) que trabalharam com gatos domésticos e LESSARD *et al*, (1999) com bovinos. LESSARD *et al.*, (1999), obtiveram resultados de seus experimentos verificando que a proteína de 25 kDa sob o efeito de congelação, pode

baixar seus níveis em até 70%, afetando a ligação espermatozóide-oócito e conseqüentemente, a taxa de fecundação.

Outro trabalho que corrobora com os resultados deste experimento é o de BACHTELL *et al* (1999), que determinaram ser possível recuperar e criopreservar espermatozóides testiculares e epididimais de humanos, porém estes espermatozóides apresentaram motilidade reduzida.

Por outro lado SOLER *et al* (2005) ao trabalharem com cervídeos determinaram ser possível recuperar espermatozóides epididimais com parâmetros de viabilidade adequados incluído a motilidade progressiva.

O processo de congelação e descongelação provoca danos na capacidade de motilidade e fecundação por alterações na membrana plasmática do espermatozóide (WATSON, 1995). Uma das alterações da membrana ocorre devido às lavagens ou diluições que podem remover proteínas, alterando assim a composição das amostras (HAMMERSTEDT *et al.*, 1990; COLLIN e BAILEY, 1999; RONCOLLETA *et al.*, 1999). As proteínas quando removidas podem modificar a relação dos lipídios impedindo o processo de reação acrossômica. A estabilidade de lipídios na membrana plasmática é pré-requisito para manter a função do espermatozóide (WATSON, 1995), e devido a isto o sêmen congelado apresenta vida fértil mais curta no trato genital da fêmea.

CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos nesse experimento conclui-se que:

- a) a motilidade total, motilidade progressiva e os defeitos de acrossoma dos espermatozóides pós-descongelamento não

diferiram ($p < 0,05$) entre os três grupos, porém o vigor foi superior no grupo dos espermatozoides colhidos com a vagina artificial;

- b) a motilidade progressiva dos espermatozoides recém colhidos, independentemente do grupo a que pertencem foi significativamente maior do que a dos espermatozoides pós-descongelamento.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos nesse experimento conclui-se que:

- a) Motilidade total, motilidade progressiva e vigor dos espermatozóides colhidos com vagina artificial diferem significativamente (5%) dos espermatozóides colhidos dos epidídimos, entretanto esses mesmos parâmetros não apresentaram diferença significativa entre os epidídimos direitos e esquerdos;
- b) Os defeitos de acrossoma dos espermatozóides não apresentaram diferença significativa entre os grupos;
- c) Os espermatozóides colhidos da cauda de epidídimos e armazenados a temperatura ambiente foram considerados viáveis por até 24 horas pós-orquiectomia.
- d) A motilidade total, motilidade progressiva e os defeitos de acrossoma dos espermatozóides pós-descongelamento não diferiram ($p < 0,05$) entre os três grupos, porém o vigor foi superior no grupo dos espermatozóides colhidos com a vagina artificial;
- e) A motilidade progressiva dos espermatozóides recém colhidos, independentemente do grupo a que pertencem foi significativamente maior do que a dos espermatozóides pós-descongelamento.

Com a melhoria dos extensores e dos métodos de colheita de células espermáticas da cauda do epidídimo se tornou possível a utilização dessas células germinativas na fertilização de oócitos, de várias espécies animais. Esta nova biotecnologia da reprodução tem grande importância na preservação de germoplasmas.

Como projeto subsequente a este, estamos realizando a verificação da capacidade de fecundação “in vitro” e “in vivo” destes espermatozoides epididimários pós-descongelamento.

REFERÊNCIAS

AMANN, R.P. Physiology and endocrinology. **Equine Reproduction**, p.658-673, 1993.

ASHER, G.W.; BERG, D.K.; EVANS, G. Storage of semen and artificial insemination in deer. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.195-211, 2000.

ASHWORTH, P.J.C.; HARRISON, R.H.P.; MILLER, N.G.A.; PLUMMER, J.M.; WATSON, P.F. Survival of ram spermatozoa at high dilution: protective effect of simple constituents of culture media as compared with seminal plasma. **Reproduction Fertility Development**, East Melbourne, v.6, n.2, p.173-180, 1994.

BACHTELL, N.E.; CONAGHAN, J.; TUREK, P.J. The relative viability of human spermatozoa from the vas deferens, epididymis and testis before and after cryopreservation. **Human Reproduction**, v.14, n.12, p.3048-3051, 1999.

BALLACHEY, B.E.; EVENSON, D.P.; SAACKE, R.G. The sperm chromatin structure assay: relationship with alternate test of semen quality and heterospermic performance of bulls. **Journal of Andrology**, Hagerstown, v.9, n.2, p.109-115, 1988.

BARKER, L.O.S.; AMANN, R.P. Epididimal physiology. II. Immunofluorescent analyses of epithelial secretion and absorption of bovine sperm maturation. **Journal Reproduction Fertility**, v.26, p.319-332, 1971.

BARTELS, P.; LUBBE, K.; KILIAN, I.; FRIEDMANN, Y. DYK, G.; MORTIMER, D. In vitro maturation and fertilization of lion (*Panthera leo*) oocytes using frozen-thawed epididymal spermatozoa recovered by cauda epididymectomy of an immobilized lion.

Theriogenology, v.53, p.325, 2000.

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

BEDFORD, J.M. The status and the state of the human epididymis. **Human Reproduction**, v.9, p.2187-2199, 1994.

BELLIN, M.E.; OYARSO, J.N.; HAWINKINS, H.E. Fertility associated antigen on bull sperm indicates fertility potential. **Journal of Animal Science**, v.76, p.2032-2039, 1998.

BERGER, T.; HORTON, M.B.; NITTA, B.J. Inhibition of sperm-oocyte interaction by an antibody to a porcine oocyte plasma membrane protein (POMP). **Biological Reproduction**, v.60, Suppl 1, p.105, 1999.

BLASH, S; MELICAN, D; GAVIN, W. Cryopreservation of epididymal sperm obtained at necropsy from goats. **Theriogenology**, v.54, n.1, p.899-905, 2000.

BRIZ, M.D.; BONET, S.; CAMPS, R. Sperm malformations throughout the boar epididymal duct. **Animal Reproduction Science**, v.43, p.221-239, 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.

CEROVSKY, J. **A new staining procedure for boar spermatozoa**. Zivocisna Vyroba, Prague, 21(5):361-6, 1976.

CHENG, A.; LE, T.; PALACOIS, M.; BOOKBINDER, L.H. et al. Sperm-egg recognition in the mouse, characterization of sp56, a sperm protein having specific affinity for ZP3. **Journal of Cell Biology**, v.125, p.867-878, 1994.

CHRISTIAN, C.; SONGSASEN, N.; LEIBO, S. Presence of motile sperm in mice 24 hours post-mortem. **Theriogenology**, v.39, p.201, 1993.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2. ed. Belo Horizonte, 1998. 49p.

COLLIN, S.; BAILEY, J.L. Assessment of intracellular calcium levels in cry preserved bovine sperm by flow cytometry. **Theriogenology**, Stoneham, v.51, n.1, p.341, 1999.

COMIZZOLI, P.; MERMILLOD, P.; COGNIE, Y.; CHAI, N.; LEGENDRE, X.; MAUGE, R.; Successful in vitro production of embryos in the red deer (*Cervus elaphus*) and the sika deer (*Cervus nippon*). **Theriogenology**, v.55, p.649-659, 2001.

EDDY, M. Spermatogenesis and HSP70 chaperones. **Biology Reproduction**, Madison. V.60, Suppl. 1, p.74, 1999.

EVANS, J.P.; WONG, G.E.; ZHU, X. et al. Sperm-egg membrane interaction during fertilization. **Biology Reproduction**, Madison, v.60, Suppl. 1, p.80, 1999.

EWING, L.L.; CHANG, T.S.K. Physiology of male reproduction. In: CAMPBELL, M.F.; WALSH, P.C. **Campbell's urology**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1986. p.200-274.

FRANCAVILLA, S.; CORDESCHI, G.; GABRIELE, A. Et al. Chromatin defects in normal and malformed human ejaculated and epididymal spermatozoa, a cytochemical ultrastructural study. **Journal Reproduction Fertility**, v.106, p.259-268, 1996.

GAGNON, A.; SULLIVAN, R. Positive effects of the co-culture of sperm with epididymal cell monolayers on the motility of bovine sperm. **Theriogenology**, Stoneham, v.51, n.1, p.343, 1999.

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

GARDE, J.; ORTIZ, N.; GARCIA, A.; GALLEGO, L.; LANDETE, C.T.; LOPEZ, A. Post-mortem assessment of sperm characteristics of the red deer during the breeding season. **Archives of Andrology**, v.41, p.195-202, 1998.

GARDNER, D.L.; THOMAS, C.A.; MARSHALL, C.E.; DEJARNETTE, J.M.; ALLEN, C.H. Seminal plasma addition protects the viability of diluted bovine sperm. **Theriogenology**, Stoneham, v.51, n.1, p.344, 1999.

GLEDHIL, B.L. Enigma of spermatozoa DNA and male infertility: a review. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v.31, p.539-549, 1970.

GOOVAERTS, I.G.F.; HOFACK, 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**, article in press.2006.

GRANEMANN, L.C.; WEISS, R.R.; KOZICKI, L.E.; MURADÁS, P.R.; TREML, T.E. Número total de espermatozoides de garanhões obtidos através da colheita com vagina artificial e por fluxo retrógrado da cauda do epidídimo. **Archives of Veterinary Science**, v.11, n.1, p.73-77, 2006.

HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K.; NOLAN, J.P. Cryopreservation of mammalian sperms: what we ask them to survive. **Journal of Andrology**, v.11, p.73-88, 1990.

HENINGER, N.L.; STAUB, C.; BLANCHARD, T.L.; JOHNSON, L.; VARNER, D.D.; FORREST, D.W. Germ cell apoptosis in the testis of normal stallions. **Theriogenology**, v.62, p.283-297, 2004.

HERRICK, J.R.; BARTELS, P.; KRISHER, R.L. Post-thaw evaluation of in vitro function of epididymal spermatozoa from four species of free-ranging African bovids. **Biology of Reproduction**, v.71, p.948-958, 2004.

HORN, M.M.; MORAES, J.C.F.; EDELWEISS, M.I.A. Evidence of differential selection of spermatozoa in the epididymes of hybrid bulls with altered spermatogenesis. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.97, p.171-174, 2002.

JAISSWAL, B.S.; MAJUNDER, G.C. Biochemical parameters regulating forward motility "in vitro" in goat immature epididymal spermatozoa. **Reproduction Fertility Development**, v.10, p.299-307, 1998.

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, p.401-404, 2002.

JEGOU, B.; De GAC, F.; IRBY, D.C. et al. Studies on somniferous tubule fluid production in the adult rat, effect of hypophysectomy and treatment with FSH, LH and testosterone. **Int. Journal of Andrology**, v.6, p.249-260, 1983.

JOHNSON, L. Spermatogenesis. **Reproduction in Domestic Animals**, v.4, p. 173-219, 1991.

JONES, R. Spermiogenesis and sperm maturation to development of fertilizing capacity. In: LAURIA, A. GANDOLFI, F.; ENNE, G.; GIANAROLI, L. **Gametes, development and function**. Roma: Serono Symposia, 1998. p.205-218.

KAABI, M.; PAZ, P.; ALVAREZ, M.; ANEL, E.; BOIXO, J.C.; ROUISSI, H.; HERRAEZ, P.; ANEL, L. Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. **Theriogenology**, v.60, p.1249-1259, 2003.

KALAB, P.; VISCONTI, P.; LECLERC, P. et al. P95, the major phosphotyrosine-containing protein in mouse spermatozoa is a hexokinase with unique properties. **Journal of Biology Chemistry**, v.269, p.3810-3817, 1994.

KARABINUS, D.; VOGLES, C.J.; SAACKE, R.G., EVENSON, D.P. Chromatin structural changes in bovine sperm after scrotal insulation of Holstein bulls. **Journal of Andrology**, Hagerstown, v.18, p.549-555, 1997.

KATILA, T.; ANDERSSON, M.; REILAS, T.; KOSKINEN, E. Post-thaw motility and viability of fractionated and frozen stallion ejaculates. **Theriogenology**, v.58, p. 241-244, 2002.

KATO, M.; MAKINO, S.; KIMURA, H.; OTA, T.; FURUHASHI, T.; NAGAMURA, Y.; HIRANO, K. *In vitro* evaluation of acrossomal status and motility in rat epididymal spermatozoa treated with α -chlorohydrin for predicting their fertilizing capacity. **Journal of Reproduction**, v. 48, p.461-468, 2002.

KIKUCHI, K.; NAGAI, T.; KASHIWAZAKI, N.; IKEDA, H.; NOGUCHI, J.; SHIMADA, A. Criopreservation and ensuing in vitro fertilization ability of boar spermatozoa from epididymides stored at 4°C. **Theriogenology**, v.50, p.615-623, 1998.

KISHIKAWA, H.; TATENO, H.; YANAGIMACHI, R. Fertility of mouse spermatozoa retrieved from cadavers and maintained at 4°C. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.116, p.217-222, 1999.

KNOLBIL, E.; NEILL, J.D. **The Physiology of reproduction**. New York: Raven Press, 1993, p.1174-1290.

KORNOVSKY, B.S.; MCCHOSEN, J.; KRENTSER, J.; TORLEY, E. The regulation of sperm motility by a novel hyaluran receptor. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v.61, n.5, p.935-940, 1994.

LAMBRECHTS, H.; NIEKERK, F.; COETZER, F.W.; CLOETE, S.; VAN DER, H.G. The effect of cryopreservation on the survivability, viability and motility of epididymal African buffalo (*Syncerus caffer*) spermatozoa. **Theriogenology**, v. 52, p.1241-1249, 1999.

LESSARD, C. PARENT, S.; LECLERC, P.; SULLIVAN, R. The protein p25b: a possible explanation of the lost of fertility of towed bull sperm. **Theriogenology**, v.51, p.347, 1999.

LIEBERMANN, J. HAEGELE, F.; STECK, T.; DIETL, J. TNF-Alpha increases the motility of sperm in normo-oligozoospermic men. **Biology Reproduction**, Madison, v.6, suppl.1, p.134, 1999.

LOVE, C. Stallion semen evaluation and interpretation. **Proceedings Society for Theriogenology**, p.93-102, 2002.

MAHONEY, M.G.; TANG, W.; XING, M.M. et al. Translocation of the zinc finger protein basonuclin from the mouse germ cell nucleus to the midpiece of the spermatozoon during spermiogenesis. **Biology Reproduction**, v.59, p.388-394, 1998.

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, p.471-485, 2006.

MARTINS, M.I.M.; SOUZA, F.F.; CHIRINÉA, V.H.; TEBET, J.M.; LOPES M.D. Viabilidade de espermatozoides criopreservados, obtidos do epidídimo de cães. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.3, p.367-368, 2003.

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

MILLER, D.J.; SHUR, B.D. Molecular basis of fertilization in the mouse. **Semen Development Biology**, v.5 p.255-264, 1994.

MOGHADAM, K.K.; NETT, R.; ROBINS, J.C.; THOMAS, M.A.; AWADALLA, S.G.; SCHEIBER, M.D.; WILLIAMS, D.B. The motility of epididymal or testicular spermatozoa does not directly affect IVF/ICSI pregnancy outcomes. **Journal of Andrology**, v.26, p.619, 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.

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

MYLES, D.G.; PRIMAKOFF, P. Function of the sperm surface proteins PH-20 and fertilin in arriving at, and fusing with, the egg. **Biology Reproduction.**, v.56, p.320-327, 1997.

NAGY, S.Z.; MERESZ, L.; VARSZEGI, J.; SZASZ, F.; IVANCSICS, J.; KOVACS, A. Relationship between sperm membrane integrity and motility. **Theriogenology**, Stoneham, v.53, p.204, 2000.

NISHIMUNE, Y.; OKABE, M. Mammalian male gametogenesis, growth, differentiation and maturation of germ cells. **Development and Growth Differentiation**, v.34, p.479-486, 1993.

NIZAN'SKI, W.; DEJNEKA, G.J.; KLIMOWICZ, M., DUBIEL, A. Evaluating some properties of domestic cat epididymal spermatozoa and their cryopreservation. **Medycyna Weterynaryjna**, v.61, n.2, p.173-178, 2005.

PAPADOPOULOS, V. Identification and purification of a human Sertoli cell-secreted protein (hSCSP-80) stimulating Leydig cell steroid biosynthesis. **Journal Clinic Endocrinology Metabolic**, v.72, p.1332-1339, 1991.

PHELPS, B.M.; MYLES, D.G. The guinea pig sperm plasma membrane protein PH-20, reaches the surface via two-transport pathways and becomes localized to a domain after initial uniform distribution. **Development Biologic**, v.123, p.63-72, 1987.

PRUNEDA, A.; PINART, E.; BRIZ, M.D.; SANCHO, S.; GARCIA, N.G.; BADIA, E.; KADAR, E.; BASSOLS, J.; BUSSALLEU, E.; YESTE, M.; BONET, S. Effects of high semen-collection frequency on the quality of sperm from ejaculates and six epididymal regions in boars. **Theriogenology**, v.63, p.2219-2232, 2005.

QIU, J.; HALES, B.F.; ROBAIN, B. Effects of chronic low-dose cyclophosphamide exposure on the nuclei of rat spermatozoa. **Biologic Reproduction**, Madion, v.52, p.33-40, 1995.

RITZEN, E.M.; BOITANI, C.; PARVINEN, M. et al. Stage-dependent secretion of ABP by rat seminiferous tubules. **Molecular Cell Endocrinology**, v.25, p.25-33, 1982.

RODRIGUE-MARTINEZ, H., LARSSON, B.; PERETOFT, H. et al. GAGs and spermatozoon competence in vivo and in vitro. In: LAURIA, A.; GANDOLFI, F.; ENNE, G.; GIANAROLI, L. **Gametes, development and function**. Roma: Serono Symposia, 1998, p.239-272.

RODRIGUEZ, C.M.; KIRBY, J.L.; HINTON, B.T. Regulation of gene transcription in the epididymis. **Reproduction**, v.122, p.41-48, 2001.

RONCOLLETA, M.; MORANI, E.S.E.; MANZANO, J. Comparação do perfil protéico de membrana de espermatozóide do sêmen fresco, diluído e pós-congelado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23, n.3, p.23, 1999.

RUSSEL, L.D.; ETTLIN, R.A.; SINHA-HIKKIM, A.P. **Histological and histopathological evaluation of the testis**. Clearwater: Cache River, 1990, p.1-40.

SABEUR, K.; GRAVANCE, C.; BALL, B.A. Effects of angiotensin II on motility in equine sperm. **Biologic Reproduction**, Madison, v.60, suppl.1, p.136, 1999.

SANKAI, T.; TSUCHIYA, H.; OGONUKI, N. Short-term nonfrozen storage of mouse epididymal spermatozoa. **Theriogenology**, v.55, p.1759-1768, 2001.

SCHONECK, C.; BRAUN, J.; EINSPANIER, R. Sperm viability is influenced "in vitro" by the bovine seminal protein aSFT effects on motility, mitochondrial activity and lipid peroxidation. **Theriogenology**, Stoneham, v.45, p.633-642, 1996.

SELIGMAN, J.; KOSOWER, N.S.; SHALGI, R. Effect of caput ligation on rat sperm and epididymis, protein thiols and fertilizing ability. **Biologic Reproduction**, v.46, p.301-308, 1992.

SETCHELL, B.P.; BOOKS, D.E. Anatomy, vasculature, innervation and fluids of the male reproductive tract. In: KNOBIL E.; NEIL, J.D. (Ed.) **The physiology of reproduction**. New York: Raven Press, 1988. p.753-836.

SHARPE, R.M. Experimental evidence for Sertoli-germ cell and Sertoli-Leydig cell interaction. In: RUSSELL, D.; GRISWOLD, M.D. **The Sertoli Cell**. Clearwater: Cache River, 1993, p.391-418.

SHIVAJI, S.; SCHEIT, K.H.; BHARGAVA, P.M. **Proteins of seminal plasma**. New York: John Wiley, 1990, 526p.

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

SOLER, A.J.; ESTESO, M.C. FERNANDEZ-SANTOS, M.R.; GARDE, J.J. Characteristics of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) spermatozoa cryopreserved after storage at 5 degrees Celsius in the epididymis for several days. **Theriogenology**, v.64, n.7, p.1503-1517, 2005.

SOLER, A.J.; GARCIA, A.J.; SANTOS, M.R.F.; ESTESO, M.C.; GARDE, A.J.J. Effects of thawing procedure on post-thawed in vitro viability and in vivo fertility of red deer epididymal spermatozoa cryopreserved at -196°C. **Journal of Andrology**, v.24, p.1-19, 2003.

SONSASEN, N.; TONG, J.; LEIBO, S. Birth of live mice derived by in vitro fertilization with spermatozoa retrieved up to twenty-four hours after death. **Journal of Experimental Zoology**, v.280, p.189-196, 1998.

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.

SYLVESTER, S.R. **Leydig cell-Sertoli cell interaction**. In: PAYNE, A.H.; HARDY, M.P.; RUSSEL, L.D. The Leydig cell. Vienna: Cache River, 1996, p.467-475.

THUNDTHIL, J.; GILL, J.; JANUSKAUSKAS, A.; LARSSON, B.; SODERQUIST, L.; MAPLETOFT, R.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Premature capacitation on fertility of frozen-thawed bull semen used in artificial insemination. **Theriogenology**, Stoneham, v.51, n.1, p.351, 1999.

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, p.225-228, 2002.

TRIBLEY, W.; KIM, J.S.; GRISWOLD, M. FSH-induced down-regulation of the FSHR gene in Sertoli cells involves repressive chromatin structure. **Biologic Reproduction**, v.60, Suppl.1, p.94, 1999.

VARRICCHIO, E.; LANGELLA, M.; MAHRAJAN, V.; PAINO, G. Structure and function of the mammalian epididymis. **Acta of Medicine Veterinary**, Napoli, v.42, p.221-234, 1996.

VIJAYARAGHAVAN, S.; STEPHENS, D.T.; TRAUTMAN, K.; SMITH, G.D.; KHATRA, B.; DA CRUZ E SILVA, E.F.; GREENGARD, P. Sperm motility development in the epididymis is associated with decreased glycogen synthase Kinase-3 and protein phosphatase 1 activity. **Biologic Reproduction**, Madison, v.54, p.709-718, 1996.

WARD, W.S.; McCARTHY, S.; KLAUS, A. et al. The function of higher order sperm chromatin structures. **Biologic Reproduction**, v.60, Suppl.1, p.84, 1999.

WATSON, P.F. Recent development of their post-thawing function. **Reproduction Fertility**. v.7,n. 1, p.871-891, 1995.

WU, N.; MURONO, E.P. A Sertoli cell-secreted paracrine factor(s) stimulates proliferation and inhibits steroidogenesis of rat Leydig cells. **Molecular Cell. Endocrinol**, v.106, p.99-109, 1994.

YEUNG, C.H.; WEINBAUER, G.F.; COOPER, T.G. Responses of monkey epididimal sperm of different maturational status to secondary messengers mediating protein tyrosine phosphorylation, acrosome reaction, and motility. **Biologic Reproduction**, Madison, v.60, suppl.1, p.206, 1999.

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

YU, Y,E.;UNNI, E.; ZHANG, Y.; et al. Spermatogenesis in mice lacking transition nuclear proteins in condensing spermatids. **Biologic Reproduction**, v.60, Suppl.1, p.76, 1999.