

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MELINA ANDREA FORMIGHIERI BERTOL

VIABILIDADE DE ESPERMATOZÓIDES BOVINOS COLHIDOS DE EPIDÍDIMOS  
MANTIDOS EM TEMPERATURA AMBIENTE DE 18-20°C

CURITIBA

2012

MELINA ANDREA FORMIGHIERI BERTOL

VIABILIDADE DE ESPERMATOZÓIDES BOVINOS COLHIDOS DE EPIDÍDIMOS  
MANTIDOS EM TEMPERATURA AMBIENTE DE 18-20°C

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Área de concentração em Biotecnologia da Reprodução Animal, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Romildo Romualdo Weiss

CURITIBA

2012

*Dedico esse trabalho ao meu avô  
Nelson Formighieri (in memoriam) onde  
quer que esteja tenho certeza que está  
muito orgulhoso de mim.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus por tudo que representa na minha vida. Sem fé nada disso seria possível, fé que conforta diante das dificuldades e fé que motiva a seguir em frente. Também agradeço a Nossa Senhora do Perpétuo Socorro, a quem rezei incessantemente para que tudo desse certo.

Aos meus pais, Margot e Moacir, exemplos de caráter e dignidade que me ensinaram todos os princípios e valores que o ser humano deve ter, e também a sempre correr atrás dos meus sonhos, com muito esforço e dedicação assim como o fizeram. Mãe, obrigado por ser tão compreensiva, amiga, confiante, dedicada e companheira. À minha irmã Mariel pela amizade incondicional e confiança. Vocês três são meu alicerce e por isso ocupam o topo dessa lista.

À minha avó Evinha Haas Formighieri, que proporcionou todas as condições para que esse trabalho fosse executado na Fazenda Casa de Pedras, e por ser muito especial na minha vida.

Ao meu namorado, companheiro e amigo Rodolfo, que participou ativamente de todos os momentos nesses últimos dois anos, compartilhando comigo as tristezas e alegrias e me apoiando nos momentos que eu achei que nada daria certo, sendo sempre muito compreensivo e leal.

À minha tia Polaca e ao meu tio Chico, que torceram muito para que tudo ocorresse bem, depois de acompanhar de perto alguns momentos de sufoco.

A toda minha família, afinal são o bem mais precioso que possuímos.

Ao amigo, mestre e exemplo de vida Prof. Dr. Romildo Romualdo Weiss, lhe conhecer foi um presente de Deus, vejo em você muito do meu avô, uma pessoa cheia de experiência e com grande visão empreendedora. A palavra que corrige e ao mesmo tempo conforta, obrigado pela orientação e por todas as nossas longas conversas, o senhor é um dos grandes responsáveis pelo meu amadurecimento pessoal e profissional.

Aos queridos Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vanete Thomaz Soccol e Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol, que são exemplos de pesquisadores para mim e para o Brasil, pela oportunidade de ingresso na Pós-graduação, vocês já fazem parte da minha família.

Ao amigo Prof. Dr. Fabiano Montiani Ferreira pela fundamental ajuda com a parte estatística do trabalho.

Ao Prof. Dr. José Antonio Dell'Aqua Junior, por ter cedido os diluentes para realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz Ernandes Kozicki pela colaboração científica.

À colega Aline Silva Fujita, por compartilhar comigo todas as dificuldades e angústias da parte experimental e também por dividir os momentos de sucesso, sua ajuda foi essencial.

Ao amigo Marcel Falleiros pela ótima companhia durante as viagens e pelas conversas agradáveis.

Ao pessoal do Centro de Estudos em Biotecnologia Aplicada à Reprodução de Ovinos e Caprinos da UNESP-Botucatu, especialmente ao Leandro Rodello e a Claudia Dias Monteiro pela disposição em colaborar e ensinar.

As alunas do curso de Medicina Veterinária da UFPR Ana Cláudia e Larissa, pela contribuição no período em que estiveram na Fazenda Casa de Pedras.

Aos demais alunos do curso de graduação de Medicina Veterinária da UFPR pela convivência nesse último ano nas aulas práticas e teóricas.

Aos demais pós-graduandos em Ciências Veterinárias, aos residentes do Hospital Veterinário da UFPR, pela convivência e encontros nos corredores.

A todos os colegas de Pós-graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, em especial a Renata, pela agradável companhia.

À amiga Michele por sempre estar disposta a colaborar, principalmente com a parte escrita e pelas longas conversas.

Às amigas, Flávia Adriana e Marina pela amizade incondicional e apoio constante.

Aos profissionais do Laboratório de Patologia Clínica da UFPR.

Aos funcionários da Fazenda Casa de Pedras, em especial ao Orlando e Valdecir que se empenharam ao máximo no manejo dos animais todos os dias demonstrando grande interesse em nosso trabalho.

Aos animais da Fazenda Casa de Pedras que colaboraram, alguns nem tanto, para que tudo desse certo.

À minha gata babi, que me fez companhia nos momentos solitários da escrita dessa dissertação.

Ao curso de Pós-graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná pela oportunidade de aprimoramento pessoal e profissional.

Ao REUNI (Reestruturação e Expansão das Universidades Federais) e a CAPES por conceder bolsa de estudos, espero ter contribuído para a educação no país.

A todas as pessoas não citadas que de alguma forma contribuíram para a realização desse sonho.

*"Disciplina é a ponte que liga nossos  
sonhos às nossas realizações."*

*(Pat Tillman)*

## RESUMO

A recuperação de espermatozóides do epidídimo de animais mortos é uma alternativa viável para preservar o material genético de animais valiosos ou de espécies ameaçadas de extinção. Os objetivos desse estudo foram verificar a viabilidade de espermatozóides colhidos da cauda de epidídimos mantidos em temperatura ambiente de 18-20°C, comparar os espermatozoides colhidos do epidídimo com os colhidos por eletroejaculação e avaliar o tempo de resistência em 5°C pós-coleta. Dez pares de testículos de touros da raça Tabapuã (*Bos taurus indicus*) foram obtidos por orquiectomia, e armazenados por 6 (G6), 12 (G12), 18 (G18), 24 (G24) e 30 (G30) horas em temperatura ambiente de 18-20°C antes da coleta dos espermatozóides da cauda do epidídimo por fluxo retrógrado. Sete dias antes da orquiectomia dos touros o sêmen foi colhido por eletroejaculação para comparação. Os parâmetros avaliados foram: motilidade espermática, vigor, concentração, porcentagem de espermatozóides morfológicamente deformados e porcentagem de defeitos de acrossoma. Os espermatozóides do epidídimo e do ejaculado foram avaliados e em seguida preservados em refrigeração (5°C) até que a motilidade fosse  $\geq 30\%$ . O parâmetro espermático mais afetado pelo tempo pós-orquiectomia foi a motilidade que apresentou uma queda significativa ( $p < 0,05$ ) para o G30. Os espermatozóides colhidos do epidídimo apresentaram menor motilidade, menor vigor e maior percentual de defeitos morfológicos que os espermatozoides colhidos por eletroejaculação. Houve uma queda pouco expressiva no vigor e aumento dos defeitos morfológicos com a progressão no tempo antes da coleta dos espermatozoides do epidídimo, entretanto a integridade do acrossoma não variou entre os grupos. A refrigeração do sêmen a 5°C conservou os espermatozóides viáveis por 15 a 40,8 horas pós-coleta. Concluiu-se que é possível recuperar espermatozóides viáveis com 41,25% de motilidade da cauda de epidídimo de touros quando armazenados em temperatura ambiente por 30 horas, além disso, os espermatozoides do epidídimo diferem dos do ejaculado apresentando menor motilidade e vigor e maior número de defeitos morfológicos, e a conservação em 5°C manteve os espermatozoides com motilidade mínima de 30 % por 15 a 40,8 horas pós-coleta permitindo a conservação em curto prazo dos gametas.

Palavras-chave: Epidídimo. Orquiectomia. Recuperação. Sêmen. Touro. Viabilidade.



## ABSTRACT

*Post-mortem* spermatozoa recovery is a viable alternative to preserve genetic material from valuable animals or endangered species. The aim of this study were to determine the viability time of spermatozoa stored in the cauda epididymis of Tabapuã bulls (*Bos taurus indicus*) at room temperature of 18-20°C, compare the spermatic parameters (motility, vigor, morphological defects in spermatozoa and acrosome defects) of spermatozoa collected from the caudal epididymal with those obtained by electro-ejaculation method, as well as assessing the resistance time of the spermatozoa when stored at 5°C post-collection. For this purpose, ten pairs of testes from Tabapuã bulls (*Bos taurus indicus*) were obtained by orquiectomy and stored for 6 (G6), 12 (G12), 18 (G18), 24 (G24) and 30 (G30) hours on room temperature of 18-20°C, before the spermatozoa recovery by retrograde flushing. Seven days before the orquiectomy, the semen was collected by electro-ejaculation method. The parameters evaluated were: sperm motility, vigor, concentration, sperm morphology and acrosome defects. The spermatozoa from the epididymis and the ejaculate were evaluated and then preserved in refrigeration (5°C). Sperm motility showed a significant decrease ( $p<0.05$ ) when spermatozoa were stored for 30 hours in the epididymis. The spermatozoa from the epididymis showed low sperm motility, vigor and higher percentage of morphological defects than spermatozoa from ejaculation. There was a little expressive reduction in vigor and increased of morphological defects with storage time, but the acrosome integrity was not affected. The cold storage (5°C) maintained sperm viable for 15 to 40.8 hours. We conclude that is possible to recovery viable sperm with 41.25% of motility from epididymis stored at room temperature of 18-20°C for 30 hours. The epididymal spermatozoa differs from the ejaculated spermatozoa which represent greater motility ( $p<0.05$ ) and less amount of total morphological defects, and conservation at 5°C maintained sperm motility at least 30% for 15 to 40.8 hours post-collection allowing temporary preservation of gametes.

Key-words: Bull. Epididymis. Orquiectmomy. Recovery. Sperm. Viability.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO SISTEMA TUBULAR DOS TESTÍCULOS E EPIDÍDIMO DO TOURO. CAB.E, CABEÇA DO EPIDÍDIMO; CAUD.E., CAUDA DO EPIDÍDIMO; CORP. E, CORPO DO EPIDÍDIMO; DD, DUCTO DEFERENTE; DE, DUCTO EPIDIDIMÁRIO; DEF, DUCTO EFERENTE; LB, LÓBULOS COM TÚBULOS SEMINÍFEROS; RT, REDE TESTIS; TR, TUBO RETO; T, TESTÍCULO.....23
- FIGURA 2 - TESTÍCULO E EPIDÍDIMO ESQUERDO E DIREITO DE TOURO TABAPUÃ (*BOS TAURUS INDICUS*). A, CABEÇA DO EPIDÍDIMO; B, CORPO DO EPIDÍDIMO; C, CAUDA DO EPIDÍDIMO.....23
- FIGURA 3 - EPIDÍDIMO ESQUERDO E DIREITO DE TOURO TABAPUÃ (*BOS TAURUS INDICUS*). A, CABEÇA DO EPIDÍDIMO; B, CORPO DO EPIDÍDIMO, C, CAUDA DO EPIDÍDIMO, D, DUCTO DEFERENTE....24
- FIGURA 4 - A, TOUROS PO-TABAPUÃ DE ELITE DA FAZENDA CASA DE PEDRAS. B, TOUROS SELECIONADOS PARA O EXPERIMENTO...50
- FIGURA 5 - A, COLETA DE SÊMEN POR ELETROEJACULAÇÃO EM TOURO TABAPUÃ; B, AMOSTRAS DE SÊMEN COLHIDAS POR ELETROEJACULAÇÃO COM DIFERENTES ASPECTOS.....51
- FIGURA 6 - A, APLICAÇÃO DA ANESTESIA LOCAL; B, INCISÃO DA PELE; C, EXPOSIÇÃO DO TESTÍCULO E EPIDÍDIMO.....53
- FIGURA 7 - POSICIONAMENTO DOS LACRES DE NÁILON ESTÉREIS PARA HEMOSTASIA DO CORDÃO ESPERMÁTICO APÓS A ORQUIECTOMIA.....53
- FIGURA 8 - TESTÍCULOS E EPIDÍDIMOS MANTIDOS EM TEMPERATURA CONTROLADA DE 18-20°C.....54

- FIGURA 9 - REGIÕES DO EPIDÍDIMO DE TOURO TABAPUÃ (*BOS TAURUS INDICUS*). A, LOCAL DE ENTRADA DA AGULHA PARA PERFUSÃO DO DILUENTE; B, REGIÃO ENTRE O CORPO E A CAUDA DO EPIDÍDIMO ONDE FOI REALIZADA A INCISÃO PARA A LIBERAÇÃO DOS ESPERMATOZÓIDES.....55
- FIGURA 10- A, TESTÍCULO E EPIDÍDIMO DE TOURO; B, EPIDÍDIMO FISICAMENTE SEPARADO DO TESTÍCULO; C, ESTRUTURA RESULTANTE DE CORTE FEITO NA JUNÇÃO DO CORPO COM A CAUDA DO EPIDÍDIMO; D, COLETA DE ESPERMATOZÓIDES DA CAUDA DO EPIDÍDIMO DE TOURO POR FLUXO RETRÓGRADO: UMA AGULHA ACOPLADA A UMA SERINGA É INTRODUZIDA NO LÚMEN DO DUCTO DEFERENTE PARA SER INJETADO O DILUENTE; E, APÓS APLICAÇÃO DE PRESSÃO O CONTEÚDO DA CAUDA DO EPIDÍDIMO EXTRAVASA PELA EXTREMIDADE OPOSTA.....56
- FIGURA 11 - FLUXOGRAMA DE EXECUÇÃO DA METODOLOGIA UTILIZADA NO ESTUDO.....57
- FIGURA 12 - MORFOLOGIA DOS ESPERMATOZÓIDES DO EPIDÍDIMO DE TOUROS EM MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASE (AUMENTO 1000X). A, GOTA CITOPLASMÁTICA PROXIMAL; B, GOTA CITOPLASMÁTICA EM TRANSLOCAÇÃO; C, GOTA CITOPLASMÁTICA DISTAL SENDO LIBERADA DA PORÇÃO FINAL DA CAUDA DO ESPERMATOZÓIDE; D, ESPERMATOZÓIDE COM ACROSSOMA EM DESLOCAMENTO.....59
- FIGURA 13- VALOR MÉDIO DO NÚMERO DE ESPERMATOZÓIDES RECUPERADOS POR ELETROEJACULAÇÃO, DOS EPIDÍDIMOS DIREITOS (EPIDÍDIMO D), DOS EPIDÍDIMOS ESQUERDOS (EPIDÍDIMO E), E DA SOMA DOS EPIDÍDIMOS DIREITOS E ESQUERDOS (EPIDÍDIMO TOTAL (D+E)) DE TOUROS TABAPUÃ .....62

## LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 - IDADE, PESO E CIRCUNFERÊNCIA ESCROTAL DOS TOUROS TABAPUÃ SELECIONADOS.....50
- TABELA 2 - VALORES MÉDIOS E DESVIO PADRÃO DE MOTILIDADE, VIGOR, PERCENTUAL DE ESPERMATOZÓIDES MORFOLÓGICAMENTE DEFORMADOS (EMD) E DEFEITOS DE ACROSSOMA DOS ESPERMATOZÓIDES COLHIDOS DA CAUDA DO EPIDÍDIMO (G6; G12; G18; G24; G30) E POR ELETROEJACULAÇÃO (EEJ) EM TOUROS TABAPUÃ.....60
- TABELA 3 - VALORES MÉDIOS DE CONCENTRAÇÃO POR ML E NÚMERO TOTAL DE ESPERMATOZÓIDES COLHIDOS DA CAUDA DO EPIDÍDIMO (G6; G12; G18; G24; G30) E POR ELETROEJACULAÇÃO (EEJ) EM TOUROS TABAPUÃ.....61
- TABELA 4 - MÉDIA E DESVIO PADRÃO DOS VALORES COMPARATIVOS ENTRE O PESO DO TESTÍCULO, O PESO DO EPIDÍDIMO, O PESO TOTAL (PESO DO TESTÍCULO + EPIDÍDIMO) E O NÚMERO TOTAL DE ESPERMATOZÓIDES RECUPERADOS (NTE) DO EPIDÍDIMO DE TOUROS TABAPUÃ.....61
- TABELA 5 - TEMPO EM HORAS EM QUE OS GRUPOS FORAM MANTIDOS EM TEMPERATURA AMBIENTE, MÉDIA E DESVIOS PADRÃO DO TEMPO DE RESISTÊNCIA A 5°C E TEMPO TOTAL DESDE A ORQUIECTOMIA ATÉ MOTILIDADE  $\geq 30\%$ , EM TOUROS TABAPUÃ.....62

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>8</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>9</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>16</b>
<b>3. OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>16</b>
<b>3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>16</b>
<b>CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>17</b>
4.1 Espermatogênese.....	18
4.2 Espermiogênese.....	18
4.3 Espermiacção.....	19
4.4 Ciclo espermatogênico.....	20
4.5 Epidídimo e maturação espermática.....	20
4.6 Coleta de espermatozóides do epidídimo.....	24
4.7 Viabilidade dos espermatozóides do epidídimo.....	26
4.8 Tempo de resistência de espermatozóides no epidídimo de animais após a morte.....	29
4.9 Preservação dos espermatozóides do epidídimo.....	32
<b>5. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>36</b>
<b>CAPÍTULO II - VIABILIDADE DE ESPERMATOZÓIDES BOVINOS COLHIDOS DE EPIDÍDIMOS MANTIDOS EM TEMPERATURA AMBIENTE DE 18-20°C</b> .....	<b>45</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>46</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>47</b>
<b>6.1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>48</b>
<b>6.2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>50</b>
6.2.1 Local e animais.....	50
6.2.2 Coleta de sêmen por eletroejaculação.....	51
6.2.3 Avaliação espermática.....	51
6.2.4 Orquiectomia bilateral.....	52
6.2.5 Armazenamento do epidídimo.....	54
6.2.6 Coleta de sêmen da cauda do epidídimo.....	54
6.2.7 Refrigeração do sêmen.....	56
6.2.8 Análise estatística.....	57
<b>6.3 RESULTADOS</b> .....	<b>58</b>
<b>6.4 DISCUSSÃO</b> .....	<b>63</b>
<b>6.5 CONCLUSÃO</b> .....	<b>68</b>
<b>6.6 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>69</b>
<b>7. ANEXOS</b> .....	<b>73</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A pecuária de corte representa a principal atividade do agronegócio brasileiro, gerando um faturamento de mais de R\$ 59 bilhões/ano e oferecendo cerca de 7,5 milhões de empregos (ABIEC, 2010). O Brasil possui o maior rebanho comercial bovino do mundo com 209,5 milhões de cabeças. Por ano são abatidos 43 milhões de animais gerando 9,3 milhões de toneladas de carne as quais 80% abastecem o mercado interno e 20% são exportadas principalmente para Hong Kong, Reino Unido, Rússia, Oriente Médio e Estados Unidos, além da exportação de animais vivos, que compreende 654,964 cabeças (IBGE, 2010). Animais geneticamente valiosos, os chamados reprodutores de elite, também movimentam valores muito altos no mercado. Chegam a valer R\$ 1 milhão, e uma única dose de seu sêmen pode ser cotada em R\$ 200. Novilhas filhas desses reprodutores são comercializadas em leilões por valores superiores a R\$ 600 mil (NASCIMENTO, 2001). Outro segmento do mercado pecuário que está em ascensão é a comercialização de touros, quem tem como objetivo promover o melhoramento genético através da renovação do plantel bovino no país. O atual plantel de touros em atividade no Brasil é estimado em 2,2 milhões de reprodutores e é recomendada uma taxa de troca anual de 20% substituindo-se 440 mil animais (ONDEI, 2011).

A capacidade reprodutiva de touros é um dos fatores determinantes para o sucesso na bovinocultura de corte, pois o macho é responsável por disseminar seu material genético para um grande número de fêmeas a ponto de um touro servir a 100 vacas sem interferência na taxa de gestação (SANTOS et al., 2004). Através da inseminação artificial esse número é ainda maior, pois o ejaculado de um macho geneticamente superior pode ser utilizado para emprenhar várias fêmeas maximizando a distribuição de genes favoráveis (BAILEY et al., 2000), assim um touro pode gerar mais de 50.000 bezerros anualmente (BRACKETT, 2006).

Animais em sistema de produção a pasto usualmente morrem inesperadamente, por estarem expostos a diversos fatores de risco como: acidentes com cobra, eletrocussão por raio, ingestão de plantas tóxicas, intoxicação, doenças infecto-contagiosas, brigas entre machos dominantes e também acidentes durante o transporte para feiras, exposições e leilões.

A morte inesperada de animais de alto valor genético ou de interesse zoológico, assim como a dificuldade na coleta de sêmen de espécies selvagens, é uma justificativa para a aplicação de técnicas de reprodução assistida para a preservação da biodiversidade como a recuperação de espermatozóides do epidídimo de animais mortos (recuperação *post-mortem*) que representa uma opção interessante para preservar gametas masculinos e para a manutenção de bancos de germoplasma (KAABI et al., 2003).

No entanto, uma das dificuldades é a recuperação dos gametas ainda viáveis, especialmente para os animais fisicamente distantes do laboratório. Em países com dimensões continentais, quando um animal geneticamente importante morre inesperadamente, na maioria das vezes não há técnico e/ou equipamentos disponíveis para recuperar o germoplasma em um curto espaço de tempo (MARTINS et al., 2009). Por isso é importante determinar a janela de oportunidade até que o material seja conduzido a um laboratório especializado e os espermatozóides possam ser recuperados ainda viáveis.

O presente trabalho foi desenvolvido conforme os propósitos estabelecidos e para efeitos didáticos será apresentando na forma de capítulos:

- CAPÍTULO I: Revisão bibliográfica
- CAPÍTULO II: Viabilidade de espermatozóides bovinos colhidos de epidídimos mantidos em temperatura ambiente de 18-20°C.

## 2. JUSTIFICATIVA

A recuperação de gametas *in vitro* diretamente do epidídimo de animais *post-mortem* ou pós-orquiectomia representa uma importante ferramenta para a obtenção de material genético de animais geneticamente diferenciados ou de espécies ameaçadas de extinção.

## 3. OBJETIVO GERAL

Determinar por quanto tempo é possível recuperar espermatozóides viáveis da cauda de epidídimos mantidos em temperatura ambiente de 18-20°C de touros (*Bos taurus indicus*) após castração.

### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos do tempo pós-orquiectomia sobre os parâmetros dos espermatozóides colhidos da cauda do epidídimo;
- Comparar os espermatozóides colhidos da cauda do epidídimo com os colhidos por eletroejaculação dos mesmos animais;
- Determinar qual a concentração de espermatozóides que pode ser obtida pela técnica de fluxo retrógrado da cauda do epidídimo de touros;
- Verificar se há diferença entre o peso do testículo e epidídimo direito e esquerdo bem como seu respectivo número de espermatozóides recuperados;
- Determinar o tempo em que os espermatozóides do epidídimo e do ejaculado se mantêm viáveis quando preservados a 5°C.



**CAPÍTULO I**  
**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## 4.1 Espermatogênese

Os testículos de um animal adulto possuem duas funções principais: produção de células germinais denominadas espermatozóides e a produção de andrógenos. O processo de formação dos espermatozóides é chamado de espermatogênese e se inicia na parede dos túbulos seminíferos através de células germinativas chamadas espermatogônias e termina com a liberação dos espermatozóides maduros no lúmen do túbulo seminífero (STABENFELDT e EDQVIST, 1996). A espermatogênese envolve proliferação por mitose, divisão por meiose e diferenciação celular (espermiogênese) para dar origem a espermátides haplóides (O'DONNELL et al., 2001).

As espermatogônias se dividem por mitose para gerar novas células-tronco que continuam com a linhagem durante toda a vida adulta do macho. As células-tronco estão periodicamente produzindo espermatogônias que se proliferam ou se diferenciam em espermatócitos primários posteriormente submetidos à meiose. A meiose permite a troca de material genético entre cromossomos homólogos para a produção de espermátides haplóides (JOHNSON et al., 2000). É um processo cíclico que começa com células primordiais que passam por diversas multiplicações e diferenciações a nível celular e molecular até a formação de espermatozóides maduros (SHIVAJI et al., 1990).

A espermatogênese pode ser dividida em oito estágios baseados na alteração da forma e posição do núcleo da espermátide e da atividade meiótica dos espermatócitos (AMANN, 1962). A eficiência da espermatogênese é representada pelo número de espermatozóides produzidos por grama de parênquima testicular (JOHNSON et al., 2000), e a maioria dos machos mamíferos em atividade reprodutiva produz milhões de espermatozóides por dia (LANDIM-ALVARENGA, 2006), no touro são formados por dia cerca de 5 a 12 bilhões de espermatozóides em ambos os testículos (GÜRTLER et al., 1984).

## 4.2 Espermiogênese

A espermiogênese é o processo específico de transformação de uma espermátide arredondada em espermatozóide alongado, com cabeça e cauda, que é posteriormente liberado pelas células de Sertoli do epitélio seminífero (BARTH e

OKO, 1989) para o lúmen dos túbulos seminíferos. Este processo envolve: formação de uma cauda que possibilitará a movimentação dentro do trato reprodutivo da fêmea, desenvolvimento da mitocôndria para produção de energia durante a movimentação e desenvolvimento do acrossoma com suas enzimas necessárias para a penetração nas camadas do ovócito (STABENFELDT e EDQVIST, 1996). Além disso, também ocorre a eliminação do citoplasma da célula espermática para que ocorra uma diminuição do seu volume em até 25%, para isso ocorre a eliminação da água contida no núcleo no citoplasma e também do corpo residual que é formado por fragmentos citoplasmáticos que não tem mais utilidade para o espermatozóide (LANDIM-ALVARENGA, 2006).

A transformação das espermatídes é classificada em quatro fases: golgi, de capuchão, acrossômica e de maturação (BRACKETT, 2006). Após a diferenciação, os espermatozoides são inférteis e imóveis, movendo-se por ação mecânica do epitélio e por fluídos secretados pelas células de Sertoli (BARTH e OKO, 1989) até o epidídimo.

A espermiogênese requer 22 a 23 dias até que o espermatozóide seja liberado no interior do túbulo seminífero (STABENFELDT e EDQVIST, 1996), e a liberação gradual dos espermatozoides no lúmen dos túbulos seminíferos é conhecida como espermição (BRACKETT, 2006).

### **4.3 Espermição**

A espermição é o processo pelo qual espermatídes maduras são liberadas a partir de células de Sertoli para o lúmen dos túbulos seminíferos antes da sua passagem para o epidídimo. O processo é realizado através de interações coordenadas de diversas estruturas, processos celulares e complexos de adesão. Leva vários dias e ocorre na borda apical do epitélio seminífero, e envolve vários estágios, incluindo a remodelação da cabeça e do citoplasma, remoção de estruturas especializadas de adesão e a liberação da espermatíde normal pelas células de Sertoli. A espermição é o passo final da maturação na espermatogênese e este processo contribui para morfologia normal dos espermatozoides refletindo diretamente na fertilidade dos machos (O'DONNELL et al., 2011)

#### 4.4 Ciclo espermatogênico

O ciclo espermatogênico é o intervalo regular de formação dos espermatozoides. No touro, o ciclo espermatogênico, caracterizado pela substituição da célula mãe por uma espermatogônia que começa a se dividir dura em torno de quatorze dias (STABENFELDT e EDQVIST, 1996), e a espermatogênese dura de quatro a cinco ciclos sucessivos. Na espécie bovina o intervalo necessário para uma espermatogônia desenvolver-se em um espermatozoide ejaculado é de aproximadamente 60 a 70 dias (BRACKETT, 2006).

#### 4.5 Epidídimo e maturação espermática

Quando o espermatozoide deixa o testículo para o enovelado de túbulos que formam o epidídimo ele é um gameta não funcional e infértil (AMANN, 1995). Somente após o trânsito pelo epidídimo é que o espermatozoide se torna maduro, adquire motilidade progressiva e se torna capaz de fecundar um oócito. Essa maturação é complexa e envolve diversos fatores, entre eles a interação da célula espermática com proteínas que são sintetizadas em cada região do epitélio epididimário (BEDFORD, 1994).

As células do epitélio do epidídimo quando cultivadas *in vitro* são capazes de prolongar a viabilidade de espermatozoides de touros, provavelmente por secretarem fatores benéficos aos gametas que prolongam sua sobrevivência (GAGNON et al., 2000).

O testículo do touro é posicionado de forma vertical e o epidídimo está ligado à parte dorsal do testículo (Figura 2) pelos ductos eferentes e pode ser dividido em três partes: cabeça, corpo e cauda (Figura 3) (SETCHELL e BROOKS, 1988) responsáveis pela concentração, maturação, transporte, proteção e armazenamento dos espermatozoides. O epidídimo possui em seu interior um ducto epididimário (Figura 1), longo e enrolado circundado por uma camada de células musculares lisas que no touro possui extensão de aproximadamente 40 metros terminando no ducto deferente.

Os espermatozoides contidos na luz do epidídimo atingem a sua maturação devido à baixa oxigenação, baixo pH intraluminal e altas concentrações de potássio,

que são inibidoras de motilidade mantendo-os estáticos com mínimo consumo de energia própria. Tal fato possibilita o amadurecimento dos espermatozóides (BARGMANN e SÁNCHEZ-LUCAS, 1968) também promovido pela passagem de macromoléculas (proteínas, lipoproteínas e glicoproteínas) do citoplasma apical das células principais ao lúmen tubular induzindo mudanças nas células espermáticas e na composição iônica do fluido luminal (AMANN, 1995).

Os espermatozóides migram passivamente através do epidídimo e quando entrar em contato com suas secreções adquirem baixo peso molecular e compostos solúveis em água por um processo de regulação isovolumétrica, RVD do inglês. Estes compostos podem ser gastos juntamente com a água celular quando as células entrarem em contato com fluídos hipo-osmóticos das glândulas acessórias ou do trato genital da fêmea. O processo de regulação de volume celular serve para manter o padrão de volume na célula espermática e evitar angulação do flagelo, que impede o espermatozóide de migrar com eficiência no trato reprodutivo da fêmea, sendo incapaz de fertilizar o oócito. Os canais responsáveis por essa regulação estão localizados nas gotas citoplasmáticas. Postula-se que os espermatozóides da cabeça do epidídimo são considerados imaturos por apresentar um conteúdo osmólito reduzido insuficiente para a regulação completa do volume celular quando expostos às soluções hipotônicas dos meios de inseminação (Cooper, 2007).

Durante o trânsito pelo epidídimo o volume da célula espermática é alterado, o núcleo é condensado, acrossoma se torna maduro e a gota citoplasmática se move distalmente a partir do colo para a extremidade da cauda. Os espermatozóides epididimais possuem gotas citoplasmáticas distais, o que não é considerado patológico por não comprometer a fertilidade (BRACKETT, 2006).

A cabeça do epidídimo absorve grandes volumes de líquidos que se originam nos túbulos seminíferos (AMANN, 1995), concentrando as células espermáticas em até 20 vezes e proporcionando correntes para o transporte dos espermatozóides ainda imóveis. Com a passagem pela cauda do epidídimo, as células espermáticas se tornam móveis pela exposição a um produto epididimário conhecido como proteína ativadora de motilidade (BRACKETT, 2006).

A movimentação dos espermatozóides pelo epidídimo é principalmente realizada pela contração dos músculos lisos da parede do segmento da cabeça e do

corpo. Na cauda, a musculatura lisa do ducto epididimário se encontra geralmente em repouso até que seja estimulada a contrair-se no momento da ejaculação (SOSTARIC et al., 2008) para a liberação dos espermatozóides.

Para que haja um aproveitamento máximo de espaço no epidídimo, os espermatozóides ficam depositados em camadas compactas, em touros com dois anos de idade, são armazenados no epidídimo aproximadamente 50 a 80 bilhões de espermatozóides (GÜRTLER et al., 1984). Bedford (1994) afirma que na espécie bovina a cauda do epidídimo armazena uma concentração de espermatozóides suficiente para até dez ejaculados sucessivos. Espermatozóides não ejaculados morrem após aproximadamente três meses na cauda do epidídimo, sendo eliminados através de espermatófagos (GÜRTLER et al., 1984) ou por descarga espontânea para a uretra para eliminação junto com a urina (BRACKETT, 2006).

O tempo de formação dos espermatozóides bovinos no testículo é de aproximadamente sessenta e um dias, e o tempo de passagem através do epidídimo é de dez a quatorze dias, totalizando aproximadamente 70 dias (GONÇALVES et al., 2008).

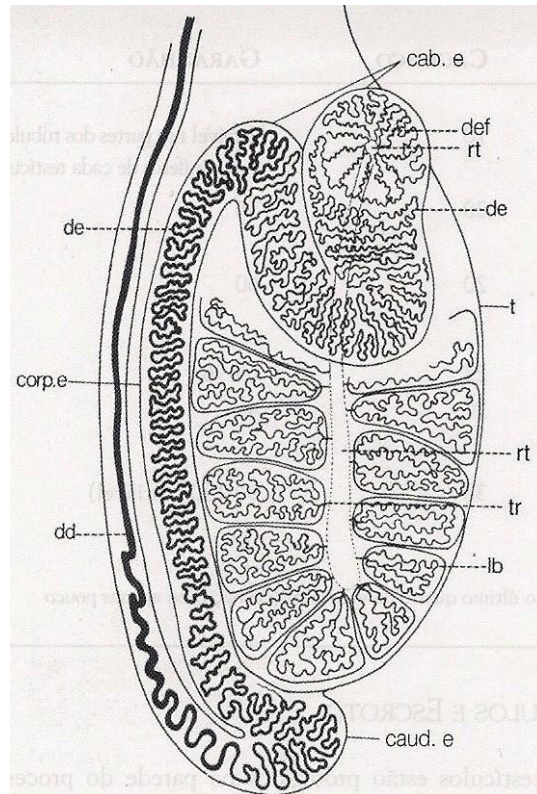


FIGURA 1- Representação esquemática do sistema tubular dos testículos e epidídimo do touro. Cab.e, cabeça do epidídimo; caud.e., cauda do epidídimo; corp. e, corpo do epidídimo; dd, ducto deferente; de, ducto epididimário; def, ducto eferente; lb, lóbulos com túbulos seminíferos; RT, rede testis; tr, tubo reto; t, testículo. Retirado de E.S.E Hafez e B. Hafez. Reprodução Animal. Manole: São Paulo, 2004, 513p.

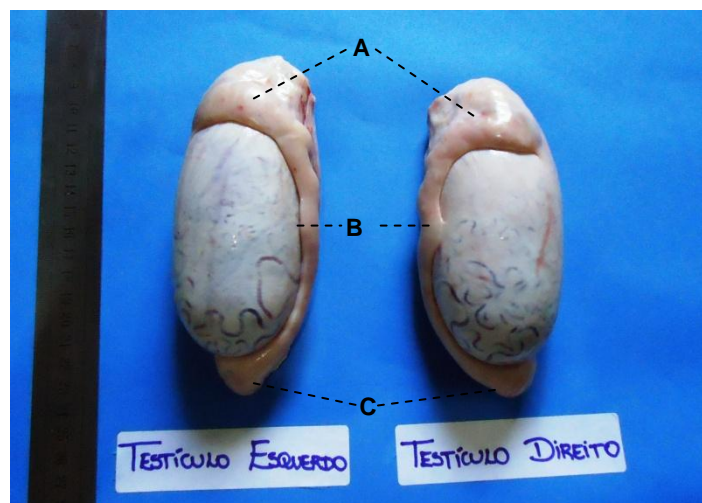


FIGURA 2- Testículo e epidídimo esquerdo e direito de touro Tabapuã (*Bos taurus indicus*). A, cabeça do epidídimo; B, corpo do epidídimo; C, cauda do epidídimo. Foto: Melina A.F.Bertol, 2011

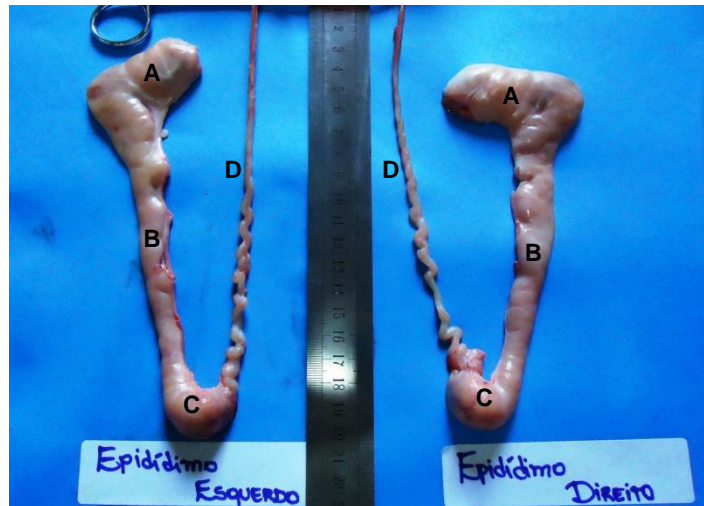


FIGURA 3- Epidídimo esquerdo e direito de touro Tabapuã (*Bos taurus indicus*). A, cabeça do epidídimo; B, corpo do epidídimo, C, cauda do epidídimo, D, ducto deferente. Foto: Melina A.F.Bertol, 2011

#### 4.6 Coleta de espermatozóides do epidídimo

A coleta de espermatozóides do epidídimo representa uma última chance de utilização dos gametas de reprodutores mortos, além de possibilitar a formação de um banco de germoplasma de animais de interesse comercial ou em ameaça de extinção (TITTARELI et al., 2006). Os espermatozóides armazenados na cauda do epidídimo geralmente são de boa qualidade e possuem um alto nível de maturação, sendo capazes de fertilizar ovócitos, tornando viável sua recuperação para posterior utilização em programas de reprodução assistida.

Existem dois momentos que antecedem a recuperação dos espermatozóides e interferem diretamente no sucesso do processo. O primeiro é o tempo desde a morte do animal até a necropsia e o segundo da recuperação das gônadas até a obtenção dos gametas no laboratório (CHATDARONG, 2011).

Muitos estudos têm demonstrado que é viável recuperar células espermáticas de epidídimos de animais mortos, porém a técnica para coleta representa um obstáculo. O método para se obter os gametas varia conforme a espécie animal, a dimensão do epidídimo e a escolha do manipulador. Yu e Leibo (2002) descrevem a recuperação de espermatozóides epididimais de pequenos animais pelo método de flutuação, que consiste em realizar cortes longitudinais e transversais na cauda do



epidídimo e depositá-la em uma placa de petri contendo meio próprio, para posterior recuperação dos espermatozóides por filtração.

No menor mamífero do mundo, o musaranho (*Tupaia belangeri*) a única técnica aplicável pelo tamanho do epidídimo nessa espécie, foi a de picotagem da cauda do epidídimo com uma tesoura própria para que ocorresse a liberação dos espermatozóides em um meio aquecido (PING et al., 2011).

Tamayo-Canul et al. (2011) realizaram inúmeras incisões com lâmina de bisturi no epidídimo de carneiros para obtenção dos gametas. Essa técnica também é usada para grandes animais devido a maior facilidade de execução, sendo em touros o método mais descrito (GOOVAERTS et al., 2006; MARTINS et al., 2007; MARTINS et al., 2009) até o momento.

Kozdrowski et al. (2011) também fizeram uso da técnica de cortar a cauda do epidídimo e enxaguá-la com diluente para recuperar espermatozóides de bisões europeus (*Bison bonasus*). Uma desvantagem dessa prática é que ocorre a contaminação das amostras com sangue e debris celulares, pois alguns vasos sanguíneos localizados na cauda do epidídimo também são rompidos durante o processo.

Garde et al. (1994) descrevem outro método no qual o lúmen do ducto deferente é canulado e perfundido com diluente, promovendo o fluxo retrógrado do conteúdo da cauda do epidídimo. Granemann et al. (2005) conseguiram recuperar um grande número de espermatozóides da cauda do epidídimo de garanhões, utilizando a técnica de fluxo retrógrado. O número total de espermatozóides colhidos da cauda dos epidídimos esquerdos e direitos dos garanhões foi significativamente superior ao número total de espermatozóides colhidos com vagina artificial, confirmando que a cauda do epidídimo possui função de armazenamento, e em cada ejaculação é liberada apenas uma parcela dos espermatozóides.

Vários estudos na espécie equina empregaram a técnica de fluxo retrógrado (MURADÁS et al., 2006; BRUEMMER, 2006; PAPA et al., 2008; HEISE et al., 2010; MONTEIRO et al., 2011) devido à anatomia favorável do epidídimo na espécie, que possui um ducto epididimário longo, com aproximadamente 70 metros (NICKEL et

al., 1979), e calibroso o que facilita sua dissecação para a injeção de diluente no lúmen.

Apesar da cotia ser um animal de pequeno porte, há relato na literatura de coleta de sêmen da cauda do epidídimo nessa espécie por fluxo retrógrado, com recuperação de  $748 \times 10^6$  espermatozóides/mL (FERRAZ et al., 2011).

Turri et al. (2011) compararam os efeitos de dois métodos de extração de espermatozóides epididimais em touros, flutuação e fluxo retrógrado. Os resultados encontrados foram: O tempo de extração do sêmen da cauda do epidídimo pelo método de fluxo retrógrado foi significativamente superior ao método de flutuação. A concentração espermática não diferiu significativamente entre os dois métodos, porém os espermatozóides recuperados por fluxo retrógrado apresentaram uma qualidade espermática maior considerando a motilidade total e a viabilidade. O método de extração não influenciou na morfologia espermática. Os autores indicam a utilização da técnica de fluxo retrógrado para recuperação de espermatozóides epididimais de touros, por resultar em amostras com boa viabilidade e sem contaminação.

MARTINEZ-PASTOR et al. (2006) afirmam que a técnica de coleta de espermatozóides da cauda do epidídimo por fluxo retrógrado resulta em amostras menos contaminadas e de melhor qualidade que os outros métodos, sendo mais indicada.

#### **4.7 Viabilidade dos espermatozóides do epidídimo**

O epidídimo ao armazenar os espermatozóides *in vivo* proporciona um ambiente favorável para conservar sua capacidade de fertilização durante várias semanas. A cauda do epidídimo tem capacidade de armazenar, até o momento da ejaculação, aproximadamente 25 a 70% do total de espermatozóides produzidos diariamente (GONÇALVES et al., 2008).

Quando estudada a histologia do epidídimo de cães descreveu-se que há um aumento progressivo do lúmen tubular através das diferentes regiões, sendo maior

na região da cauda epididimária, configurando um local de estocagem de espermatozóides (SCHIMMING et al., 2002).

Os espermatozóides coletados do epidídimo estão livres do fluido seminal que é adicionado pelas glândulas acessórias durante a ejaculação, e serve como veículo, estimulante do metabolismo espermático e proporciona a energia necessária para o espermatozóide passar pelo útero (BARTH e OKO, 1989). O plasma seminal é rico em eletrólitos, frutose, ácido ascórbico, diversas enzimas e vitaminas (BRACKETT, 2006).

Para que ocorra melhora na fertilidade dos espermatozóides do epidídimo Tiplady et al. (2002) sugerem que seja feita a adição de plasma seminal ou outro diluente que possua os componentes necessários para manter a viabilidade espermática sem que haja redução da motilidade.

É importante que qualquer que seja o meio, tenha em sua composição substâncias favoráveis aos espermatozóides. Pasquini et al. (2008) coletaram espermatozóides de epidídimos de garanhões e incubaram por 15 minutos com diluente, plasma seminal e meios nutrientes e não observaram diferença significativa entre os grupos para motilidade total, progressiva e porcentagem de células rápidas na avaliação antes do congelamento.

Quando se faz a incubação do sêmen da cauda do epidídimo de gatos domésticos, depois do congelamento, com plasma seminal e diluente, o plasma seminal é menos benéfico aos espermatozóides que o diluente (THUWANUT e CHATDARONG, 2009). Por outro lado, a adição de plasma seminal à solução acrescentada no descongelamento dos espermatozóides do epidídimo de cachorros antes da inseminação artificial, aumenta as taxas de prenhez e o número de leitões por ninhada quando comparado ao grupo controle que não recebeu o plasma seminal (OKAZAKI et al., 2012).

Sabe-se que apesar dos espermatozóides da cauda do epidídimo já estarem maduros, eles diferem dos do ejaculado. Weiss et al. (2008) compararam espermatozóides do epidídimos direito e esquerdo com espermatozóides do

ejaculado de garanhões e observaram que os espermatozóides do ejaculado possuem maior motilidade total e progressiva.

Silva et al. (2003) ao comparar características morfofisiológicas de amostras de sêmen do epidídimo e do ejaculado de touros, observaram que os espermatozóides do ejaculado apresentam maior motilidade progressiva. Além disso, os espermatozóides epididimais apresentaram um número significativamente superior de defeitos espermáticos representado pela presença de gotas citoplasmáticas distais.

Gloria et al. (2011) descrevem que os espermatozóides da cauda do epidídimo e do ejaculado de asininos apresentam motilidade total e progressiva similares, porém quando avaliada a morfologia espermática os autores relatam que há uma porcentagem alta de gotas citoplasmáticas distais nos espermatozóides da cauda do epidídimo que é raramente detectada nos espermatozóides do ejaculado.

Durante o trânsito pelo epidídimo ocorre a migração caudal da gota citoplasmática que se desloca da base da cabeça para a cauda do espermatozóide (COOPER, 2011). Num trabalho realizado em touros, Horn et al. (2002) avaliaram a morfologia dos espermatozóides da cabeça, parte proximal do corpo, parte distal do corpo e cauda do epidídimo e constataram que há uma diminuição significativa no percentual de gotas proximais, distais e defeitos totais ao longo do epidídimo. Contri et al. (2012) observaram um significativo aumento da porcentagem de gotas citoplasmáticas distais e ao mesmo tempo a diminuição de gotas citoplasmáticas proximais nas células espermáticas ao longo do epidídimo de asininos.

Waheed et al. (2011) encontraram concentração e motilidade espermática significativamente superior nos espermatozóides recuperados do corpo e da cauda que da região da cabeça do epidídimo de camelos.

Os espermatozóides do epidídimo, assim como os do ejaculado podem ser empregados em técnicas de reprodução assistida. Sua habilidade de fertilização *in vitro* e *in vivo* já foi comprovada por alguns autores. Em touros o sêmen coletado da cauda de epidídimos mantidos em 5°C já foi utilizado para a produção *in vitro* de embriões (MARTINS et al., 2009) e para a inseminação artificial de vacas. Costa et

al. (2011) descrevem o nascimento de bezerros normais após inseminação artificial utilizando espermatozóides criopreservados obtidos de epidídimos refrigerados de bovinos *post-mortem*. Papa et al. (2008) relatam a inseminação de 18 éguas, com espermatozóides coletados da cauda do epidídimo de garanhões, as quais 12 ficaram prenhes. Os espermatozóides de suínos, colhidos de epidídimos e armazenados por um dia a 4°C foram utilizados para inseminação artificial de porcas e resultaram no nascimento de leitões normais (KIKUCHI et al., 1999).

Ao comparar a fertilidade do sêmen colhido do epidídimo e do ejaculado de garanhões, Monteiro et al. (2011) afirmam que a taxa de éguas prenhes após inseminação é similar entre os grupos inseminados com o sêmen do ejaculado ou com espermatozóides colhidos do epidídimo imediatamente após a orquiectomia ou com 24 horas de armazenamento a 5°C.

Em animais selvagens, Santiago-Moreno et al. (2006) descrevem o nascimento de um Ibex espanhol (*Capra pyrenaica hispanica*) a partir de inseminação artificial com espermatozóides coletados de epidídimos. Ringleb et al. (2011) utilizaram a técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozóides com boas taxas de fertilização de oócitos de gatos domésticos após maturação *in vitro*.

Em trabalho realizado para avaliar a segurança do método de injeção intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI) do epidídimo em humanos, as crianças nascidas a partir de ICSI com espermatozóides do epidídimo foram acompanhadas e comparadas àquelas nascidas de ICSI com espermatozóides do ejaculado e por fecundação *in vitro* de embriões. Os resultados mostraram que o método obteve sucesso, por não provocar malformações fetais, natimortos ou problemas no desenvolvimento não diferindo dos métodos convencionais (WOLDERINGH et al., 2011).

#### **4.8 Tempo de resistência de espermatozóides no epidídimo de animais após a morte**

Após a morte, os espermatozóides sobrevivem por período limitado dentro dos epidídimos, o que viabiliza a obtenção de gametas de animais mortos. É importante ressaltar que esse período varia de acordo com as condições de clima e

temperatura que o processo é executado (SILVA et al., 2004) e também da causa da morte dos animais.

Sabe-se que a refrigeração tem um efeito benéfico em vários parâmetros de qualidade dos espermatozóides, principalmente na motilidade, pois há uma redução na taxa metabólica mantendo-os viáveis por mais tempo (SALAMON e MAXWELL, 2000), e também por provocar a conservação dos tecidos após a morte, diminuindo a autólise responsável pela redução dos parâmetros espermáticos (TITTARELI et al., 2006).

Kaabi et al. (2003), ao comparar diferentes temperaturas de armazenamento dos epidídimos de carneiros antes da coleta dos espermatozoides concluíram que a refrigeração possibilita a obtenção de amostras com melhor qualidade do que o armazenamento em temperatura ambiente. Os autores ainda descrevem que ao armazenar os epidídimos por 0, 24 e 48 horas *post-mortem* a 5°C nas primeiras 24 horas não há variações expressivas na viabilidade espermática, que cai significativamente somente depois de 48 horas de armazenamento.

Lone et al. (2011) estudaram o efeito de duas temperaturas durante o transporte das gônadas na qualidade de espermatozóides recuperados de epidídimos de carneiros afim de desenvolver um protocolo para a preservação de gametas que possa ser aplicado para ruminantes selvagens mortos ou resultado de caça. Depois do transporte os gametas foram mantidos em 4°C por 0, 24, 48 e 72 horas. Os resultados mostram que os espermatozóides transportados entre 4,9 e 6°C apresentaram em geral maior integridade de acrossoma, motilidade total, contagem de espermatozóides vivos, concentração e também maior número de anormalidades espermáticas que os espermatozóides transportados entre 17,9 e 21.5°C. Nos dois tratamentos houve viabilidade espermática até 72 *post-mortem*. Os autores só recomendam utilizar o transporte em temperatura ambiente se os espermatozóides forem utilizados imediatamente.

Yu e Leibo (2002) obtiveram testículos de cães através de orquiectomia e após armazenar por oito dias em 4°C conseguiram recuperar espermatozóides móveis e com membrana intacta. Martinez-Pastor et al. (2005) recuperaram

espermatozóides de ruminantes selvagens em até 72 horas *post-mortem* mantendo os epidídimos em 5°C.

A recuperação *post-mortem* de espermatozóides epididimais tem sido utilizada em várias espécies de cervídeos selvagens (ASHER et al., 2000). Soler et al. (2005) estudaram a influência do armazenamento prolongado em baixas temperaturas de epidídimos de veados Ibéricos (*Cervus elaphus hispanicus*), e ao distribuir os epidídimos em grupos referentes ao tempo decorrido antes da coleta (12, 24, 48, 72 e 96 horas) observaram que a motilidade dos espermatozóides não diminui significativamente até 96 horas. Porém, para obter bons resultados no congelamento de sêmen estabelecem um limite máximo de 48 horas *post-mortem*.

Fernández-Santos et al. (2011) conseguiram recuperar espermatozóides viáveis do epidídimo de caprinos entre 2 e 24 horas *post-mortem* e observaram que a motilidade espermática diminui com o tempo. Os autores demonstraram que o tempo *post-mortem* provoca alterações principalmente na estrutura, permeabilidade e elasticidade da membrana dos espermatozoides.

Martins et al. (2009) ao armazenar epidídimos de touros por diferentes períodos de tempo em 5°C, relatam que nas primeiras 24 horas nenhuma mudança na motilidade total ocorreu quando comparada ao grupo controle, porém houve uma queda significativa após 48 horas.

Tittarelli et al. (2006) avaliaram a habilidade de sobrevivência de espermatozóides em epidídimos de cães e gatos quando armazenados em temperatura de 4°C por 24, 48 e 72 horas. Nas duas espécies, os espermatozóides recuperados em 72 horas apresentaram uma redução significativa em todos os parâmetros estudados (motilidade, velocidade, viabilidade, integridade de membrana plasmática e morfologia do acrossoma) quando comparados com os recuperados em 24 horas.

Gañán et al. (2009) estudaram o efeito da estocagem de epidídimos de gatos domésticos em 5°C sobre os espermatozóides recuperados em diferentes períodos *post-mortem* (0, 24, 48 e 72 horas). Os autores descrevem que longos períodos de armazenamento resultam em quedas significativas de motilidade espermática.

Partindo do pressuposto que a maioria dos animais morre no campo inviabilizando o armazenamento em baixas temperaturas é essencial que estudos sejam conduzidos em condições mais próximas a realidade. Nesse contexto, Garde et al. (1998) trabalharam em temperatura ambiente e conseguiram obter espermatozóides epididimais viáveis de veados ibéricos (*Cervus elaphus*) em até 20 horas do período *post-mortem*.

Em gatos domésticos esse período é ainda mais curto, sendo recomendado no máximo 12 horas de exposição à temperatura ambiente sem que ocorra queda nos parâmetros espermáticos para posterior preservação eficiente dos gametas (TOYONAGA et al., 2011).

Muradás et al. (2006) observaram um limite de 24 horas para a coleta de espermatozóides viáveis de epidídimos armazenados à temperatura ambiente em garanhões. Os autores compararam os espermatozóides colhidos do epidídimo com os colhidos através de vagina artificial e observaram que todas as amostras dos epidídimos após 24 horas, apresentaram espermatozóides com qualidade significativamente inferior aos obtidos com a vagina artificial.

#### **4.9 Preservação dos espermatozóides do epidídimo**

A preservação do sêmen através do resfriamento ou congelamento permite o armazenamento em curto ou longo prazo dos gametas, facilitando o transporte por longas distâncias e sua utilização em programas de inseminação artificial (BAILEY et al., 2000). Além disso, a criopreservação dos espermatozóides recuperados do epidídimo possibilita a formação de um banco genético de animais de interesse comercial ou de animais em extinção, imprescindível para a conservação das espécies. Criopreservação é uma ferramenta complementar importante para a conservação evitando perdas excessivas de variação genética ou extinção de raças (GANDINI et al., 2007).

Ao passar pelo processo de criopreservação os espermatozóides sofrem uma redução na fertilidade quando comparados ao sêmen fresco. Ocorre perda da viabilidade espermática e diminuição da função da população dos sobreviventes. O processo é prejudicial às células espermáticas pela mudança brusca de temperatura



e pelo estresse osmótico e tóxico causado durante a exposição aos crioprotetores e também pela formação e dissolução de cristais de gelo na célula (WATSON, 2000).

A criopreservação do sêmen do epidídimo de espécies selvagens é um instrumento para disseminação do material genético desses animais contribuindo para a conservação da biodiversidade. Ping et al. (2011) provaram ser possível congelar os espermatozóides colhidos de epidídimo de pequenos mamíferos selvagens e após o descongelamento obtiveram gametas com boa motilidade, integridade de acrossoma e habilidade de fertilização *in vitro* e *in vivo*.

Fernandes-Santos et al. (2011) aplicaram a tecnologia de congelamento para preservar com sucesso os espermatozóides coletados do epidídimo de ruminantes selvagens (*Capra pyrenaica*). O processo de congelamento é responsável por causar alterações nas células espermáticas. Em estudo conduzido na África do Sul, foram caracterizados os espermatozóides do epidídimo de gazelas (*Antidorcas marsupialis*), impalas (*Aepyceros melampus*) e antílopes (*Damaliscus dorcus phillipsi*) quanto à motilidade, morfologia e longevidade pré e pós-congelamento. O processo de criopreservação resultou em perdas na motilidade, viabilidade e integridade da membrana plasmática além de danos às membranas acrossomais aos espermatozóides do epidídimo nas três espécies (CHATIZA et al., 2011).

O diabo-da-tasmânia tem sofrido uma drástica redução populacional pela epidemia de uma doença tumoral fatal. No sentido de evitar a extinção dessa espécie, Keeley et al. (2011) coletaram amostras de espermatozóides do epidídimo *post-mortem* e caracterizaram os parâmetros espermáticos além de preservar a curto-prazo os gametas em refrigeração com sucesso.

Herold et al. (2006) estudaram métodos de congelamento de espermatozoides do epidídimo de búfalos africanos. Os gametas foram recuperados logo após a morte dos animais através da injeção de ar em fluxo retrógrado na cauda do epidídimo e diferentes tempos de equilíbrio em diluente antes do congelamento foram estabelecidos, mas não houve influência na qualidade das células espermáticas pós-congelamento. Além disso, foram testados dois diluentes comerciais e um deles destacou-se por manter maior número de espermatozóides movendo-se progressivamente após o descongelamento.

Ansari et al. (2010) afirmam que a criopreservação de espermatozóides recuperados da cauda do epidídimo é uma ferramenta viável para preservar os gametas de touros de alto valor genético. No estudo os autores demonstram bons resultados com diluentes à base de ácido cítrico e gema de ovo para criopreservação de espermatozóides epididimais de touros indianos da raça Sahiwal (*Bos taurus indicus*).

Os protocolos utilizados para interferem diretamente na taxa de fertilidade do sêmen. Alapati et al. (2009) compararam o transporte de água pela membrana plasmática durante o resfriamento dos espermatozóides do ejaculado e do epidídimo de touros e não encontraram diferenças significativas, o que sugere que os protocolos utilizados para o resfriamento e congelamento de sêmen do ejaculado podem ser aplicados de maneira similar aos espermatozóides colhidos do epidídimo.

Weiss et al. (2008) congelaram com sucesso os gametas colhidos da cauda do epidídimo de dez garanhões com o mesmo protocolo convencional utilizado no congelamento dos espermatozóides do ejaculado.

Tamayo-Canul et al. (2011) compararam diferentes métodos de estocagem dos espermatozóides no epidídimo e a osmolaridade dos diluentes para melhorar o protocolo de congelamento dos espermatozóides do epidídimo de carneiros. Os autores relatam que apesar da qualidade do sêmen antes e depois do congelamento diminuir com o tempo *post-mortem*, a combinação do método de estocagem com o diluente ideal pode minimizar esses efeitos.

Em suínos foi realizado trabalho que demonstrou o potencial antioxidante do alecrim contribuindo para a proteção da membrana dos espermatozóides do epidídimo aos danos causados durante a criopreservação (MALO et al., 2011).

Thuwanut et al. (2008) descrevem algumas modificações para melhorar o protocolo de congelamento de espermatozóides do epidídimo de gatos. Na pesquisa conclui-se que a suplementação com cisteína e vitamina E ao diluente de congelamento melhora a motilidade total, progressiva, e a integridade do DNA e da membrana dos espermatozóides.

É preciso estar atento as variações na resposta aos protocolos de resfriamento e congelamento de sêmen. Os efeitos individuais do macho interferem diretamente na longevidade dos espermatozoides durante a preservação. Os mamíferos podem ser considerados “bons” ou “maus” congeladores ou resfriadores de sêmen, de acordo com as características da estrutura da membrana plasmática do espermatozoide que é determinada geneticamente e predispõe a sobrevivência ao estresse térmico (WATSON, 2000). Esse fato permite classificar os espermatozoides como resistentes ou susceptíveis a criopreservação.

Dados encontrados por Lasley e Mayer (1944) mostram que a sobrevivência de espermatozoides do ejaculado e do epidídimo de bovinos é dependente de um fator de variação fisiológico entre touros responsável por influenciar sua resistência em condições ambientais adversas, como o choque térmico.

Vários autores descrevem os impactos individuais dos machos nos protocolos de congelamento e resfriamento do sêmen (HERNANDÉZ et al., 2007; AURICH, 2008; MEDRANO et al., 2010) o que provoca variação nos resultados entre indivíduos.

#### 4. REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE - (ABIEC). **Pecuária Brasileira**, 2010. Disponível em: <www.abiec.com.br >. Acesso em: 20/11/2011.

ALAPATI, R.; STOUT, M.; SAENZ, J.; GENTRY JR., G.T.; GODKE, R.A.; DEVIREDDY, R.V. Comparison of the permeability properties and post-thaw motility of ejaculated and epididymal bovine spermatozoa. **Cryobiology**, v.59, p.164-170, 2009.

AMANN, R.P. Reproductive capacity of dairy bulls. IV. Spermatogenesis and testicular germ cell degeneration. **American Journal of Anatomy**, v.110, p.69-78, 1962.

AMANN, R.P. The vital role of the epididymis. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 1995, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, p.213-222, 1995.

ANSARI, M.S.; RAKHA, B.A.; ANDRABI, S.M.H.; ULLAH, N.; AKHTER, S. Cryopreservation of Sahiwal Bull Epididymal Spermatozoa. **Pakistan Journal of Zoology**, v.42, n.6, p.741-743, 2010.

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.

AURICH, C. Recent advances in cooled-semen technology. **Animal Reproduction Science**, v.107, p.268-275, 2008.

BAILEY, J.L.; BILODEAU, J.F.; CORMIER, N. Semen preservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. **Journal of Andrology**, v.21, p.1-7, 2000.

BARGMANN, W.V.; SÁNCHEZ-LUCAS, J.G. **Histología y anatomía microscópicas humanas**. Barcelona: Labor, 1968. 956p.

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 human epididymis. **Human reproduction**, v.9, p. 2187-2199, 1994.

BRACKETT, B.G. Reprodução em mamíferos do sexo masculino. In: REECE, W.O. **Dukes-Fisiologia dos animais domésticos**. 12.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, p.623-643.

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

CHATDARONG, K. Gamete Rescues from Gonads of Wild Animal *Post-mortem*. **Thai J Vet Med Suppl**, v.41, p.99-102, 2011.

CHATIZA, F.P.; PIETERSE, G.M.; BARTELS, P.; NEDAMBALE, T.L. Characterization of epididymal spermatozoa motility rate, morphology and longevity of springbok (*Antidorcas marsupialis*), impala (*Aepyceros melampus*) and blesbok (*Damaliscus dorcus phillipsi*): Pre- and post-cryopreservation in South Africa. **Animal Reproduction Science**, v.126, p.234-244, 2011.

CONTRI, A.; GLORIA, A.; ROBBE, D.; DE AMICIS, I.; CARLUCCIO, A. Characteristics of donkey spermatozoa along the length of the epididymis. **Theriogenology**, v.77, p.166-173, 2012.

COOPER, T.G. Sperm maturation in the epididymis: a new look at an old Problem. **Asian Journal of Andrology**, v.9, n.4, p.533-539, 2007.

COOPER, T.G. The epididymis, cytoplasmic droplets and male fertility. **Asian Journal of Andrology**, v.13, p.130-138, 2011.

COSTA, P.M.; MARTINS, C.F.; FRANCO, V.O.; REZENDE, L.O.F.; SERENO, J.R.B.; CAMPOS, H.C.F. Nascimento de bezerros normais após inseminação artificial utilizando espermatozoides criopreservados obtidos de epidídimos refrigerados de bovinos após a morte. **Ciencia Rural**, v.4, n.5, p.869-874, 2011.

FERNÁNDEZ-SANTOS, M.R.; SOLER, A.J.; RAMÓN, M.; ROS-SANTAELLA, J.L.; MAROTO-MORALES, A.; GARCÍA-ÁLVAREZ, O. et al. Effect of *post-mortem* time on post-thaw characteristics of Spanish ibex (*Capra pyrenaica*) spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.129, p.56-66, 2011.

FERRAZ, M.S.; DE MENEZES, D.J.A.; PESSOA, G.T.; CABRAL, R.M.; ILLERA, M.J.; SILVA, A.R.; CARVALHO, M.A.M. Collection and evaluation of epididymal sperm in captive agoutis (*Dasyprocta aguti*). **Theriogenology**, v.75, p.459-462, 2011.

GAGNON, A.; SULLIVAN, R. SIRARD, M.A. Epididymal Epithelial Cells Cultured In Vitro Prolong the Motility of Bovine Sperm. **Journal of Andrology**, v.21, n.6, p.842-847, 2000.

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

GANDINI, G.; PIZZI, F.; STELLA, A.; BOETTCHER, P.J. The costs of breed reconstruction from cryopreserved material in mammalian livestock species. **Genetics Selection Evolution**, v.39, p.465-479, 2007.

GARDE, J.; ORTIZ, N.; GARCIA, A.; GALLEGRO, 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.

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.

GLORIA, A.; CONTRI, A.; DE AMICIS, I.; ROBBE, M.; CARLUCCIO, A. Differences between epididymal and ejaculated sperm characteristics in donkey. **Animal Reproduction Science**, v.128, p.117-122, 2011.

GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.de; FREITAS, V.J.F. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. 2.ed. São Paulo: Roca, 2008, 395p.

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**, v.66, n.2, p.323-330, 2006.

GRANEMANN, L.C.; WEISS, R.R.; KOZICKI, L.E.; MURADAS, 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, 2005.

GÜRTLER, H.; KETZ, H.A.; KOLB, E.; SCHRADER, L.; SEIDEL, H. **Fisiologia veterinária**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1984. 612p.

HEISE, A.; KÄHN, W.; VOLKMANN, D.H.; THOMPSON, P.N.; GERBER, D. Influence of seminal plasma on fertility of fresh and frozen-thawed stallion epididymal spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.118, n.1, p 48-53, 2010.

HERNÁNDEZ, M.; ROCA, J.; GIL, M.A.; VÁZQUEZ, J.M; MARTÍNEZ, E.A. Adjustments on the cryopreservation conditions reduce the incidence of boar ejaculates with poor sperm freezability. **Theriogenology**, v.67, p.1436-1445, 2007.

HEROLD, F.C.; DE HAAS, K.; COLENBRANDER, B.; GERBER, D. Comparison of equilibration times when freezing epididymal sperm from Africanbuffalo (*Syncerus caffer*) using Triladyl™ or AndroMed®. **Theriogenology**, v.66, n.5, p.1123-1130, 2006.

HORN, M.M.; MORAES J.C.F.; EDELWEISS, M.I.A. Evidência de seleção espermática diferencial no epidídimo de touros de genótipo híbrido com alteração na espermatogênese. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.97, p.171-174, 2002.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Pesquisa Pecuária Municipal**, Comunicação Social, 2010. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2010/default.shtm>>. Acesso em: 20/11/2011.

JHONSON, L. Spermatogenesis. In: CUPPS, P. T. **Reproduction in Domestic Animals**. San Diego: Academic Press, v.4, Cap.5, p.174-220, 1991.

JOHNSON, L.; VARNER, D.D.; ROBERTS, M.E.; SMITH, T.L.; KEILLOR, G.E.; SCRUTCHFIELD, W.L. Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.471-480, 2000.

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

KEELEY, T.; MCGREEVY, P.D.; O'BRIEN, J.K. Characterization and short-term storage of Tasmanian devil sperm collected *post-mortem*. **Theriogenology**, v.76, p.705-714, 2011.

KIKUCHI, K.; KASHIWAZAKI, N.; NAGAI, T.; NOGUCHI, J.; SHIMADA, A.; TAKAHASHI, R.; HIRABAYASHI, M.; SHINO, M.; UEDA, M.; KANEKO, H. Reproduction in Pigs Using Frozen-Thawed Spermatozoa from Epididymis Stored at 4 C. **Journal of Reproduction and Development**, v.45, n.5, p.345-350, 1999.

KOZDROWSKI, R.; NIŻAŃSKI, W.; DUBIEL, A.; OLECH, W. Possibilities of using the European bison (*Bison bonasus*) epididymal spermatozoa collected *post-mortem* for cryopreservation and artificial insemination: a pilot study. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.9, n.1, p.31-36, 2011.

LANDIM-ALVARENGA, F. Fecundação e Clivagem. In: PRESTES, N.C.; LANDIM-ALVARENGA, F. **Obstetrícia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, p. 2-21.

LASLEY, J.F.; MAYER, D.T. A Variable Physiological Factor Necessary for the Survival of Bull Spermatozoa. **Journal of Animal Science**, v.3, p.129-135, 1944.

LONE, F.A.; ISLA, R.; KHAN, M.K.; SOFI, K.A. Effect of transportation temperature on the quality of cauda epididymal spermatozoa of ram. **Animal Reproduction Science**, v.123, p.54-59, 2011.

MALO, C.; GIL, L.; CANO, R.; MARTÍNEZ, F.; GALÉ, I. Antioxidant effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) on boar epididymal spermatozoa during cryopreservation. **Theriogenology**, v.75, p.1735-1741, 2011.

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

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



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

MARTINS, C.F.; RUMPF, R.; PEREIRA, D.C.; DODE, M.N. Cryopreservation of epididymal bovine spermatozoa from dead animals and its uses *in vitro* embryo production. **Animal Reproduction Science**, v.101, p.326-331, 2007.

MEDRANO, A.; TERRAZAS, A.; SOTO, R. Principles and perspectives for the conservation of goat buck spermatozoa. **Small Ruminant Research**, v.89, p.140-143, 2010.

MONTEIRO, G.A.; PAPA, F.O.; ZAHN, F.S.; DELL'AQUA JR., J.A.; MELO, C.M.; MAZIERO, R.R.D.; AVANZI, B.R.; ALVARENGA, M.A.; GUASTI, P.N. Cryopreservation and fertility of ejaculated and epididymal stallion sperm. **Animal Reproduction Science**, v.127, p.197-201, 2011.

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

NASCIMENTO, S. Touros milionários chegam a gerar até 100 mil bezerros. **Folha online**, 2001. Disponível em: <<http://www1.folha.uol.com.br/folha/dinheiro/ult91u37194.shtml>>. Acesso em: 20 de dezembro de 2011.

NICKEL, R.A.; SCHUMMER, A.; SEIFERLE, E. Male genital organs. In: **The Viscera of the Domestic Mammals**. 2.ed. Berlin: Paul Parey, 1979, 401p.

O'DONNELL, L.; NICHOLLS, P.K.; O'BRYAN, M.K.; MCLACHLAN, R.I.; STANTON, P.G. Spermiation: The process of sperm release. **Spermatogenesis**, v.1, n.1, p.14-35, 2011.

O'DONNELL, L.; ROBERTSON, K.M.; JONES, M.E.; SIMPSON, E.R. Estrogen and spermatogenesis. **Endocrine Reviews**, v.22, n.3, p.289-318, 2001.

OKAZAKI, T.; AKIYOSHI, T.; KAN, M.; MORI, M. TESHIMA, H.; SHIMADA, M. Artificial insemination with seminal plasma improves the reproductive performance of frozen-thawed boar epididymal spermatozoa. **Journal of Andrology**, 2012, article in press.

ONDEI, V. Xô, touro. Chegou a hora de renovar o plantel de reprodutores no País. Em jogo, um mercado de R\$ 2 bilhões. **Dinheiro Rural**, 2011. Disponível em: <<http://www.terra.com.br/revistadinheiro rural/edicoes/82/artigo228077-1.htm>>. Acesso em: 20 de dezembro de 2011.

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

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

PING, S.; WANG, F.; ZHANG, Y.; WU, C.; TANG, W.; LUO, Y.; YANG, S. Cryopreservation of epididymal sperm in tree shrews (*Tupaia belangeri*). **Theriogenology**, v.76, p.39-46, 2011.

RINGLEB, J.; WAURICH, R.; WIBBELT, J.; STREICH, W.J.; JEWGENOW, K. Prolonged storage of epididymal spermatozoa does not affect their capacity to fertilise *in vitro*-matured domestic cat (*Felis catus*) oocytes when using ICSI. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, n.6, p.818-825, 2011.

SALAMON, S., MAXWEL, W.M. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.77-111, 2000.

SANTIAGO-MORENO, J.; TOLEDANO-DIAZ, A.; PULIDO-PASTOR, A.; GOMEZ-BRUNET, A.; LOPEZ-SEBASTIAN, A. Birth of live Spanish ibex (*Capra pyrenaica hispanica*) derived from artificial insemination with epididymal spermatozoa retrieved after death. **Theriogenology**, v.66, p.283-291, 2006.

SANTOS, M.D.; TORRES, C.A.A.; RUAS, J.R.M.; GUIMARÃES, J.D.; SILVA FILHO, J.M. Potencial reprodutivo de touros da raça Nelore submetidos a diferentes proporções touro:vaca. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.4, p.497-503, 2004.

SCHIMMING, B.C.; VICENTINI, C.A.; TIRAPELLI, L.F.; TIRAPELLI, D.C.P. Observações morfológicas no ducto epididimário do cão. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.39, n.2, p. 61-65, 2002.

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

SHIVAJI, S.; SCHEIT, K.H.; BHARGAVA, P.M. Proteins of seminal plasma. **Bioscience and Reproduction**, v.8, p.609-618, 1990.

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.

SILVA, A.R.; MORATO, R.G.; SILVA, L.D.M. The potential for gamete recovery from non-domestic canids and felids. **Animal Reproduction Science**, v.81, p.159-175, 2004.

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

SOSTARIC, E.; AALBERTS, M.; GADELLA, B.M.; STOUT, T.A.E. The roles of the epididymis and prostasomes in the attainment of fertilizing capacity by stallion sperm. **Animal Reproduction Science**, v.107, v.3-4, p.237-248, 2008.

STABENFELDT, G.H.; EDQVIST, E. Processos reprodutivos no macho. In: SWENSON, M.J.; REECE, W.O. **Dukes-Fisiologia dos animais domésticos**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996, p.603-614.

TAMAYO-CANUL, J.; ÁLVAREZ, M.; MATA-CAMPUZANO, M.; ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ, M.; PAZ, P. de.; ANEL, L.; MARTÍNEZ-PASTOR, F. Effect of storage method and extender osmolality in the quality of cryopreserved epididymal ram spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.129, p.188-199, 2011.

THUWANUT, P.; CHATDARONG, K.; TECHAKUMPHU, M.; AXNÉR, E. The effect of antioxidants on motility, viability, acrosome integrity and DNA integrity of frozen-thawed epididymal cat spermatozoa. **Theriogenology**, v.70, n.2, p.233-240, 2008.

THUWANUT, P.; CHATDARONG, K. Incubation of Post-Thaw Epididymal Cat Spermatozoa with Seminal Plasma. **Reproduction in Domestic Animals**, v.44, n.2, p.381-384, 2009.

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.

TITTARELLI, C.; SAVIGNONE, C. A.; ARNAUDÍN, E.; STORNELLI, M. C.; STORNELLI, M.A.; DE LA SOTA, R.L. Effect of storage media and storage time on survival of spermatozoa recovered from canine and feline epididymides. **Theriogenology**, v.66, n.6, p.1637-1640, 2006.

TOYONAGA, M.; KAIHARA, A.; TSUTSUI, T. The Quality of Cryopreserved Sperm Collected from Feline Caudal Epididymides Stored at Room Temperature. **The Journal of Veterinary Medical Science**. v.73, n.10, p.1395-1398, 2011.

TURRI, F.; MADEDDU, M.; GLIOZZI, T.M.; GANDINI, G.; PIZZI, F. Influence of recovery methods and extenders on bull epididymal spermatozoa quality. **Reproduction in Domestic Animals**. Article in press.

WAHEED, M.M.; AL-EKNAH, M.M.; EL-BAHR, S.M. Some biochemical characteristics and preservation of epididymal camel spermatozoa (*Camelus dromedarius*). **Theriogenology**, v.76, p.1126-1133, 2011.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with criopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.481-492, 2000.

WEISS, R.R.; MURADÁS, P.R.; GRANEMANN, L.C.; MEIRA, C. Freezing sperm from cauda epididymis of castrated stallions. **Animal Reproduction Science**, v.107, p.356, 2008. Abstract.

WOLDRINGH, G.H.; HORVERS, M.; JANSSEN, A.J.W.M.; REUSER, J.J.C.M.; GROOT, S.A.F.de.; STEINER, K.; D'HAUWERS, K.W.; WETZELS, A.M.M. KREMER, J.A.M. Follow-up of children born after ICSI with epididymal spermatozoa. **Human Reproduction**, v.26, n.7 p.1759-1767, 2011.

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

## **CAPÍTULO II**

### **VIABILIDADE DE ESPERMATOZÓIDES BOVINOS COLHIDOS DE EPIDÍDIMOS MANTIDOS EM TEMPERATURA AMBIENTE DE 18- 20°C**

## RESUMO

A recuperação de espermatozoides do epidídimo de animais mortos é uma alternativa viável para preservar o material genético de animais valiosos ou de espécies ameaçadas de extinção. Os objetivos desse estudo foram verificar a viabilidade de espermatozoides colhidos da cauda de epidídimos mantidos em temperatura ambiente de 18-20°C, comparar os espermatozoides colhidos do epidídimo com os colhidos por eletroejaculação e avaliar o tempo de resistência dos espermatozoides em 5°C pós-coleta. Dez pares de testículos de touros da raça Tabapuã (*Bos taurus indicus*) foram obtidos por orquiectomia, e armazenados por 6 (G6), 12 (G12), 18 (G18), 24 (G24) e 30 (G30) horas em temperatura ambiente de 18-20°C antes da coleta dos espermatozoides da cauda do epidídimo por fluxo retrógrado. Sete dias antes da orquiectomia, o sêmen dos touros foi colhido por eletroejaculação para comparação. Os parâmetros avaliados foram: motilidade espermática, vigor, concentração, porcentagem de espermatozoides morfologicamente deformados e porcentagem de defeitos de acrossoma. Os espermatozoides do epidídimo e do ejaculado foram avaliados e em seguida preservados em refrigeração (5°C) até que a motilidade fosse  $\geq 30\%$ . A motilidade espermática apresentou uma queda significativa ( $p < 0,05$ ) para o G30. Os espermatozoides colhidos do epidídimo apresentaram menor motilidade que os espermatozoides colhidos por eletroejaculação. Houve uma queda pouco expressiva no vigor e aumento dos defeitos morfológicos com a progressão no tempo antes da coleta dos espermatozoides, entretanto a integridade do acrossoma não variou entre os grupos. A refrigeração do sêmen a 5°C conservou os espermatozoides viáveis por 15 a 40,8 horas pós-coleta. Concluiu-se que é possível recuperar espermatozoides viáveis e com 41,25% de motilidade da cauda de epidídimo de touros quando armazenados em temperatura ambiente por 30 horas, além disso, os espermatozoides do epidídimo diferem dos do ejaculado apresentando menor motilidade e vigor e maior número de defeitos morfológicos, e a conservação em 5°C manteve os espermatozoides com motilidade mínima de 30 % por 15 a 40,8 horas pós-coleta permitindo a conservação em curto prazo dos gametas.

**Palavras-chave:** epidídimo, orquiectomia, recuperação, sêmen, touro, viabilidade

## ABSTRACT

*Post-mortem* spermatozoa recovery is a viable alternative to preserve genetic material from valuable animals or endangered species. The aim of this study were to determine the viability time of spermatozoa stored in the cauda epididymis of Tabapuã bulls (*Bos taurus indicus*) at room temperature of 18-20°C, compare the spermatoc parameters (motility, vigor, morphological defects in spermatozoa and acrosome defects) of spermatozoa collected from the caudal epididymal with those obtained by electro-ejaculation method, as well as assessing the resistance time of the spermatozoa when stored at 5°C post-collection. For this purpose, ten pairs of testes from Tabapuã bulls (*Bos taurus indicus*) were obtained by orquiectomy and stored for 6 (G6), 12 (G12), 18 (G18), 24 (G24) and 30 (G30) hours on room temperature of 18-20°C, before the spermatozoa recovery by retrograde flushing. Seven days before the orquiectomy, the semen was collected by electro-ejaculation method. The parameters evaluated were: sperm motility, vigor, concentration, sperm morphology and acrosome defects. The spermatozoa from the epididymis and the ejaculate were evaluated and then preserved in refrigeration (5°C). Sperm motility showed a significant decrease ( $p<0.05$ ) when spermatozoa were stored for 30 hours in the epididymis. The spermatozoa from the epididymis showed low sperm motility than spermatozoa from ejaculation. There was a little expressive fall in vigor and increased of morphological defects with storage time, but the acrosome integrity was not affected. The cold storage (5°C) maintained sperm viable for 15 to 40.8 hours. We conclude that is possible to recovery viable sperm with 41.25% of motility from epididymis stored at room temperature of 18-20°C for 30 hours. The epididymal spermatozoa differs from the ejaculated spermatozoa which represent greater motility ( $p<0.05$ ) and less amount of total morphological defects, and conservation at 5°C maintained sperm motility with minimum 30% for 15 to 40.8 hours post-collection allowing temporary preservation of gametes.

**Key-words:** bull, epididymis, orquiectmomy, recovery, sperm, viability

## 6.1 INTRODUÇÃO

A morte inesperada de animais de alto valor genético, assim como a dificuldade na coleta de sêmen de espécies selvagens, conduz à necessidade de aplicação de técnicas reprodutivas assistidas visando à preservação da biodiversidade (KAABI et al., 2003). Para isso o primeiro passo é a obtenção de células espermáticas desses animais. Nesse contexto, a coleta de sêmen diretamente da cauda do epidídimo representa uma alternativa promissora quando por algum motivo não é possível obter-se gametas através da ejaculação. A cauda do epidídimo dos mamíferos é responsável por armazenar os espermatozóides viáveis até o momento da ejaculação proporcionando um ambiente favorável para conservar sua capacidade de fertilização por várias semanas (JONES, 2004).

Recuperar e criopreservar espermatozóides do epidídimo de animais mortos (recuperação *post-mortem*) é uma opção viável para manter um banco de germoplasma (TITTARELLI et al., 2006), tornando possível a utilização de gametas de animais valiosos a qualquer momento. Estudos atuais têm demonstrado que espermatozóides do epidídimo possuem potencial de fertilização *in vitro* e *in vivo*, e já foram utilizados para a inseminação artificial, fecundação *in vitro* de embriões e injeção intracitoplasmática de espermatozóides com bons resultados (SANTIAGO-MORENO et al., 2006; MARTINS et al., 2007; PAPA et al., 2008; COSTA et al., 2011; MONTEIRO et al., 2011; RINGLEB et al., 2011).

Primeiramente é preciso recuperar os gametas ainda viáveis, o que representa uma dificuldade, pois muitas vezes os animais morrem no campo e só são localizados depois de várias horas. Em países com dimensões continentais, quando um animal geneticamente valioso morre inesperadamente, na maioria das vezes não há técnicos ou equipamentos disponíveis para recuperar e preservar os gametas em um curto intervalo de tempo (MARTINS et al., 2009). Por isso é necessário desenvolver-se protocolos de manipulação do testículo e epidídimo a fim de estabelecer uma janela de oportunidade para a recuperação dos gametas.

Os espermatozóides sobrevivem por um tempo limitado dentro dos epidídimos após a morte antes que ocorra degeneração (SONGSASEN et al., 1998), ressaltando-se que esse período varia de acordo com as condições de clima e temperatura a que são expostos (TITTARELLI et al., 2006). O ideal é realizar a



coleta dos gametas imediatamente após a morte dos animais, porém isso não é possível na prática. Estudos em diferentes espécies descrevem que quando os epidídimos são mantidos em refrigeração após a morte, os espermatozóides se mantêm viáveis por períodos longos (MARTINEZ-PASTOR et al., 2005; SOLER et al., 2005; TITTARELI et al., 2006; MARTINS et al., 2009), mas numa visão realista da pecuária extensiva de corte no Brasil, quando encontramos um animal morto, muitas vezes já se passaram várias horas em que a carcaça ficou exposta a temperatura ambiente. Em países de clima tropical a temperatura ambiente predominante durante o ano gira em torno de 20°C.

Estudos em várias espécies avaliaram a resistência dos espermatozóides na cauda de epidídimos mantidos em temperatura ambiente (GARDE et al., 1998; MURADÁS et al., 2006; WEISS et al., 2008; TOYONAGA et al., 2011) porém, para a espécie bovina são muito escassos os relatos sobre a recuperação de gametas nessas condições.

Há vários métodos para a extração de espermatozóides do epidídimo variando de acordo com a espécie animal, a dimensão do epidídimo e a escolha do manipulador. O método mais indicado é o fluxo retrógrado, que em touros permite a obtenção de espermatozóides com boa viabilidade e sem contaminação (TURRI et al., 2011).

O presente estudo teve como objetivos verificar a viabilidade de espermatozóides colhidos da cauda de epidídimos de touros Tabapuã (*Bos taurus indicus*) após orquiectomia quando mantidos em temperatura ambiente de 18-20°C por 6, 12, 18, 24 e 30 horas, avaliar a eficiência da técnica de fluxo retrógrado para a obtenção de espermatozoides epididimais na espécie bovina, verificar se há diferença entre o testículo direito e esquerdo quanto ao peso e o número de espermatozóides recuperados, comparar os espermatozoides colhidos do epidídimo com os colhidos pelo método de eletroejaculação assim como determinar o tempo de resistência dos espermatozóides em refrigeração (5°C) pós-coleta.

## 6.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 6.2.1 Local e animais

O trabalho foi realizado em uma fazenda situada no sudoeste do estado do Paraná, Brasil (latitude 25°37'0.4.4''sul, longitude 52°48'58.9'' oeste e altitude de 505m), no período de maio a agosto de 2011. Dez touros da raça Tabapuã (*Bos taurus indicus*), idade média de 63 meses e peso médio de 573 Kg foram selecionados (Tabela 1). Durante o experimento os animais foram mantidos em sistema extensivo de pastejo em capim estrela (*Cynodon* spp) e distribuídos em piquetes com sombreamento, água e sal mineral<sup>1</sup> *ad libitum*.



FIGURA 4- A, Touros PO-Tabapuã de Elite da Fazenda Casa de Pedras. B, Touros PO - Tabapuã selecionados para o experimento.

Tabela 1 – Idade, peso e circunferência escrotal dos touros Tabapuã selecionados.

Touro	Idade (meses)	Peso (Kg)	Circunferência escrotal (cm)
1	48	492	36
2	46	400	32
3	96	688	41
4	38	537	33
5	95	726	39
6	48	510	33
7	46	550	32
8	46	476	35
9	85	658	39
10	83	700	42

<sup>1</sup>FOSBOVI 30, Tortuga, São Paulo, Brasil

### 6.2.2. Coleta de sêmen por eletroejaculação

Inicialmente foram feitas duas coletas, com intervalo de três dias, para selecionar os animais e estabilizar os parâmetros espermáticos. Sete dias depois foi realizada nova coleta para obtenção da amostra representando o sêmen do ejaculado.

Antes da coleta, foi estimulada a micção e a defecação dos touros para diminuir as chances de contaminação. Realizou-se a tricotomia dos pelos do prepúcio e em seguida foi feita a higienização com solução fisiológica estéril aquecida a 37°C, mediante a introdução de um tubo flexível no óstio prepucial. Para a coleta foi utilizado o aparelho de eletroejaculação TK 800, aplicando-se sucessivos estímulos elétricos de corrente contínua durante 3 segundos com 3 segundos de intervalo até a liberação do ejaculado em um tubo graduado estéril.



FIGURA 5- A, Coleta de sêmen por eletroejaculação em touro Tabapuã; B, amostras de sêmen colhidas por eletroejaculação com diferentes aspectos.

### 6.2.3 Avaliação espermática

Após a coleta, o sêmen foi diluído com diluente à base de leite desnatado<sup>2</sup> na proporção de 1:1 (v/v) e mantido em banho-maria a 29°C por uma hora para estabilização dos espermatozóides. As amostras de todos grupos foram avaliadas observando-se os parâmetros de motilidade (0-100% de espermatozóides móveis) e vigor espermático (0-5; 0=ausência de movimento progressivo e 5=movimento

<sup>2</sup> Botu-Turbo®, Botupharma, Botucatu, Brasil

vigoroso e veloz) através de análise subjetiva em microscópio óptico<sup>3</sup> em pelo menos cinco campos por diferentes avaliadores aplicando-se a média. Também foram avaliadas a concentração espermática, a morfologia espermática e os defeitos de acrossoma. A concentração espermática foi determinada em hemocítômetro à diluição de 1:100 (sêmen: solução de formol-salino tamponado (Anexo 1)). O resultado foi dado em número de células/mL e ao multiplicar o valor pelo volume total da amostra obteve-se o número total de espermatozóides.

Para avaliação das características morfológicas dos espermatozóides uma alíquota de vinte µL de sêmen foi diluída em dois mL de solução tamponada de formol-salino. As alíquotas foram acondicionadas em micro tubos de fundo cônico de polipropileno (1,5 mL) e estocadas à temperatura de 4 a 5°C para posterior leitura. A morfologia espermática e a integridade do acrossoma foram determinadas em microscopia de contraste de fase<sup>4</sup> em aumento de 1000x sob imersão através de preparações úmidas, classificando-se 200 células por preparação (Blom, 1973).

#### **6.2.4 Orquiectomia bilateral**

Sete dias após a coleta de sêmen por eletroejaculação os touros foram orquiectomizados. O procedimento cirúrgico foi executado após contenção adequada dos animais e em cada cordão espermático efetuou-se o bloqueio anestésico local infiltrando-se 10 mL de cloridrato de lidocaína sem vasoconstritor<sup>5</sup> no cordão espermático e 5 mL na linha de incisão em cada testículo. Após a antisepsia tópica foi efetuada uma incisão horizontal de aproximadamente 10 centímetros na região lateral do testículo com bisturi, seccionando-se a pele, túnica dartos, camada celulosa, túnica fibrosa, folheto parietal e visceral da túnica vaginal e o ligamento inguino-testicular até a exposição do testículo e epidídimo. O cordão espermático foi então liberado da túnica vaginal e tracionado até o aparecimento de sua porção mais delgada. Para a hemostasia do cordão espermático foram utilizadas duas abraçadeiras estéreis de náilon (1mm de largura) em sentido transversal ao cordão (Figura 7), distantes dois centímetros entre si, pressionando-as ao máximo com ajuda de um alicate. Uma pinça de Kelly foi posicionada ventralmente ao segundo laço, e o cordão espermático foi seccionado dois

---

<sup>3</sup> Bioval L-200, São Paulo

<sup>4</sup> Olympus BX41, Toquio, Japão

<sup>5</sup> Xylestesin<sup>®</sup>, Cristália, Itapira, Brasil

centímetros abaixo da ligadura. Verificada a ausência de sangramento ativo, a pinça foi solta e a estrutura resultante liberada. O procedimento foi repetido no testículo contralateral. Na ferida cirúrgica, foi aplicado spray de solução cicatrizante e repelente e o animal foi liberado.

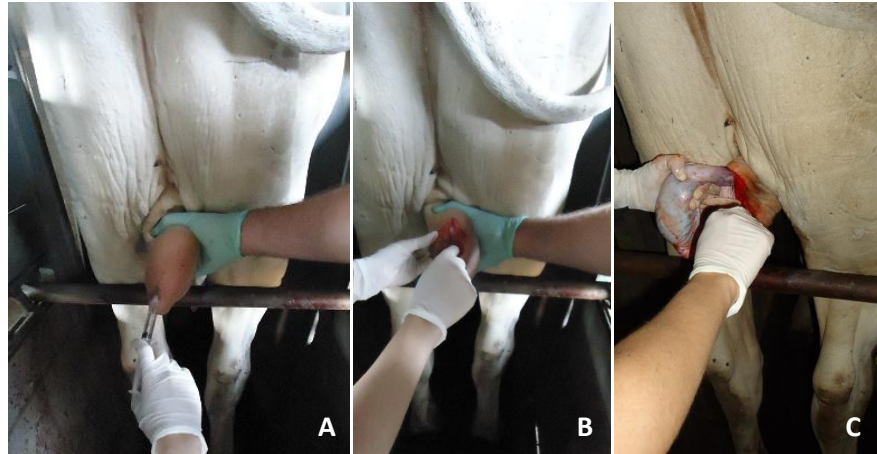


FIGURA 6- A, aplicação da anestesia local; B, incisão da pele; C, exposição do testículo e epidídimo.

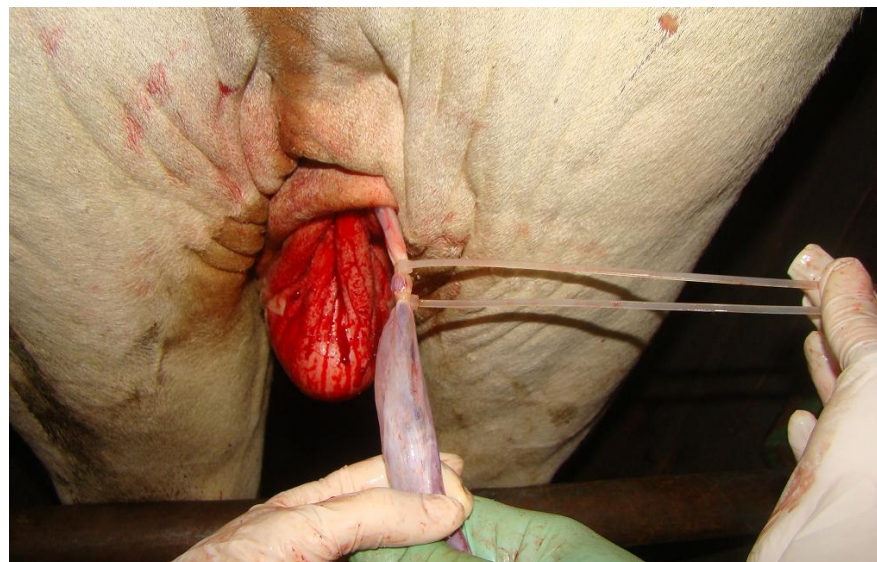


FIGURA 7 – Posicionamento dos lacres de náilon estéreis para hemostasia do cordão espermático após a orquiectomia.

### 6.2.5 Armazenamento do epidídimo

Imediatamente após a orquiectomia os testículo e epidídimos foram acondicionados em sacos plásticos identificados e mantidos em temperatura controlada de 18-20°C por 6 a 30 horas de acordo com os grupos. Os 20 epidídimos foram aleatoriamente divididos em cinco grupos, representando o tempo pós-orquiectomia, sendo 6(G6), 12(G12), 18(G18), 24(G24) e 30(G30) horas, totalizando quatro epidídimos por grupo.



FIGURA 8- Testículos e epidídimos mantidos em temperatura controlada de 18-20°C.

### 6.2.6 Coleta de sêmen da cauda do epidídimo

Decorrido o tempo determinado pós-orquiectomia, o complexo testículo-epidídimo foi lavado com solução de ringer-lactato previamente aquecida a 37°C para remover restos de sangue e contaminantes. O epidídimo foi separado do testículo (minuciosa dissecação) e as estruturas foram pesadas em balança digital. Em seguida, a região da cauda e o ducto deferente foram isolados do corpo e da cabeça do epidídimo (Figura 10). Após o processo é imprescindível que tanto a cauda do epidídimo quanto o ducto deferente permaneçam intactos. A técnica utilizada para recuperação dos espermatozoides foi a de fluxo retrógrado conforme descrita por Martinez-Pastor et al. (2006), com adaptações. Após dissecação precisa do ducto deferente e da porção final do ducto epididimário, foi feita a lavagem da

cauda do epidídimo com um volume fixo de 20 mL do mesmo diluente<sup>6</sup> utilizado no sêmen do ejaculado, aquecido a 37°C e com osmolaridade corrigida para a espécie bovina (20 mL de água destilada para cada 100 mL do meio).

A solução foi injetada no lúmen do ducto deferente mediante a delicada introdução de uma agulha hipodérmica de 0,7mm aclopada a uma seringa de 3 mL. O diluente seguiu o trajeto inverso ao fisiologicamente percorrido pelos espermatozoides (Figura 9), e após aplicação de pressão o conteúdo emergiu por um corte feito na junção do corpo com a parte proximal da cauda do epidídimo. Os espermatozoides diluídos foram depositados em um recipiente aquecido e transferidos para um banho-maria a 29°C por uma hora para adaptação e estabilização. Passado esse período foram repetidas as mesmas análises realizadas para o sêmen colhido por eletroejaculação.

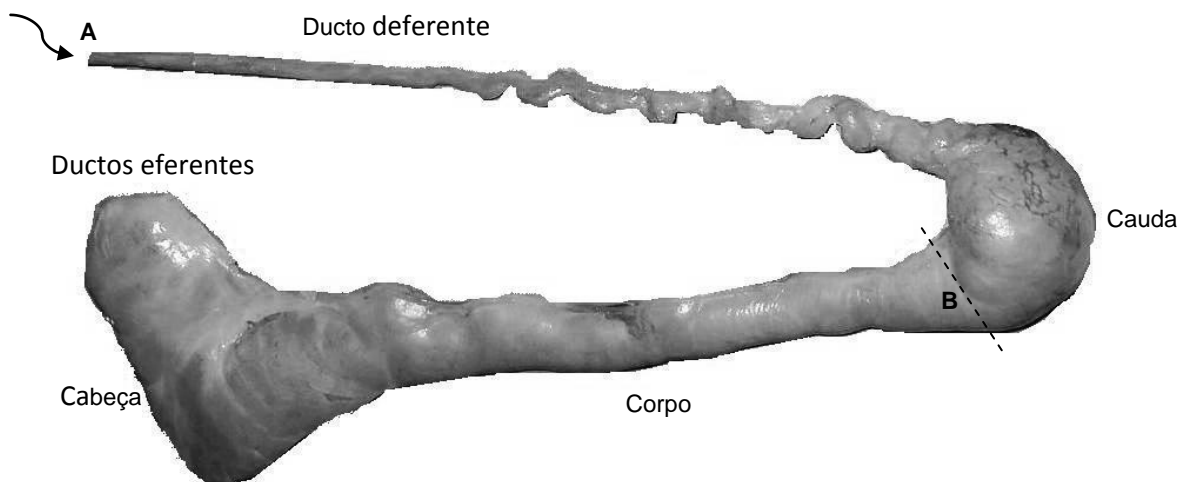


FIGURA 9- Regiões do epidídimo de touro Tabapuã (*Bos taurus indicus*). A, local de entrada da agulha para perfusão do diluente; B, região entre o corpo e a cauda do epidídimo onde foi realizada a incisão para a liberação dos espermatozoides.

<sup>6</sup>Botu-Turbo®, Botupharma, Botucatu, Brasil

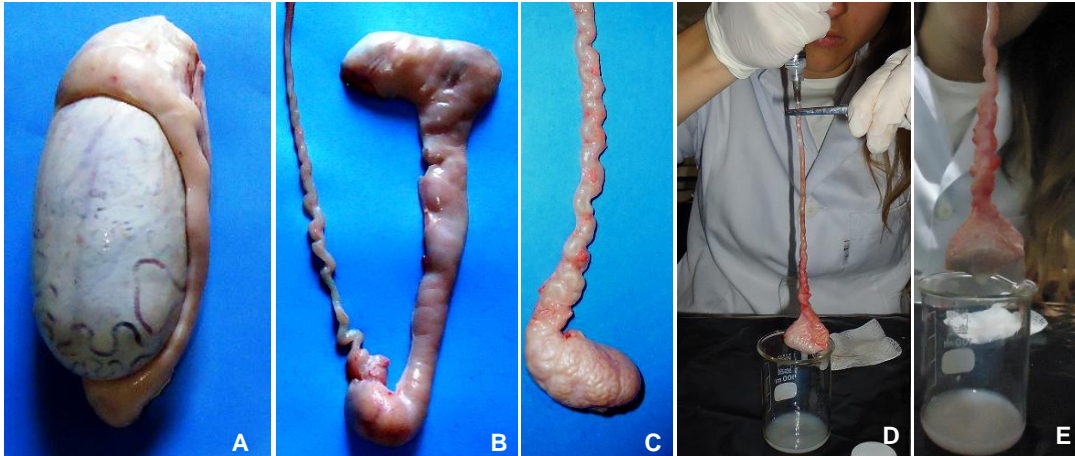


FIGURA 10- A, Testículo e epidídimo de touro; B, Epidídimo fisicamente separado do testículo; C, Estrutura resultante de corte feito na junção do corpo com a cauda do epidídimo; D, Coleta de espermatozóides da cauda do epidídimo de touro por fluxo retrógrado: Uma agulha acoplada a uma seringa é introduzida no lúmen do ducto deferente para ser injetado o diluente; E, Após aplicação de pressão o conteúdo da cauda do epidídimo extravasa pela extremidade oposta.

### 6.2.7 Refrigeração do sêmen

Para a conservação do sêmen sob refrigeração foi utilizado container para transporte e manutenção de sêmen refrigerado<sup>7</sup> o qual baseia-se em uma curva de refrigeração (Anexo 3) até estabilização da temperatura final de 5°C com tempo máximo de refrigeração de 48 horas. Segundo recomendações do fabricante o volume mínimo para ser armazenado é de 100 mL, para isso um frasco com água foi utilizado até completar o volume. Nesse momento as amostras de espermatozóides do epidídimo direito e esquerdo foram unidas formando uma amostra total do epidídimo para poder comparar-se com o sêmen do ejaculado que também foi refrigerado. As amostras foram alocadas em micro tubos de fundo cônico de polipropileno com capacidade de 2 mL e foi acrescentado igual volume de meio de refrigeração<sup>8</sup> em cada amostra para posterior acondicionamento no container.

A cada 6 horas uma alíquota de sêmen era avaliada para motilidade total em microscópio óptico em lâmina e lamínula aquecidas a 37°C, até atingir o valor mínimo de 30% de espermatozóides móveis.

<sup>7</sup> Botutainer®, Botupharma, Botucatu, Brasil

<sup>8</sup> Botu-Turbo®, Botupharma, Botucatu, Brasil



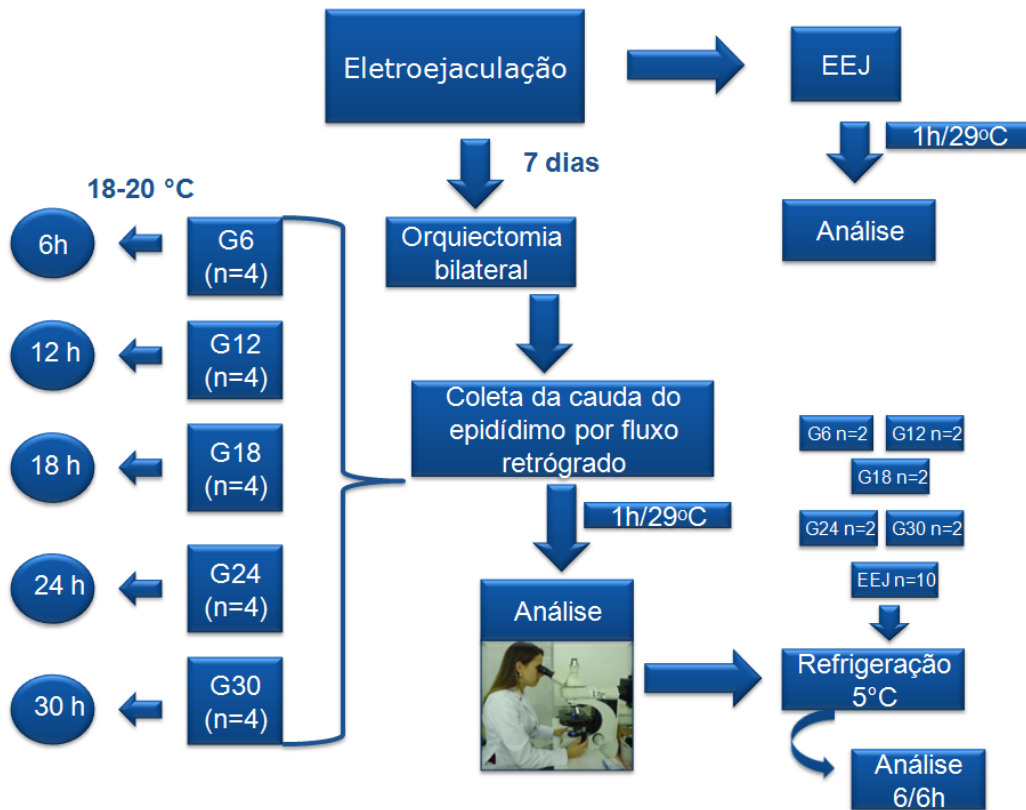


FIGURA 11- Fluxograma de execução da metodologia utilizada no estudo

### 6.2.8 Análise estatística

Os dados obtidos no experimento inicialmente foram submetidos ao Teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Para os dados de distribuição não Gaussiana ou para as variáveis categóricas ordinais usou-se o teste de Kruskal–Wallis (EMD, defeitos de acrossoma, motilidade total e vigor), com o pós-teste de Dunn. Para as variáveis contínuas numéricas de distribuição Gaussiana (concentração/mL e número total de espermatozoides recuperados) empregou-se o teste ANOVA, com o pós-teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados significantes. Para execução da estatística descritiva e inferencial usou-se o software StatView (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA).

### 6.3 RESULTADOS

As características seminais dos touros incluídos no experimento estavam de acordo com os parâmetros considerados normais para a espécie. Analisando os animais individualmente para o sêmen colhido por eletroejaculação houve uma variação entre 75 e 95% na motilidade espermática, o vigor não variou atingindo o valor máximo para todos os animais (5). Quanto ao percentual de espermatozóides morfologicamente deformados houve uma variação de 3 a 16%, sendo que os defeitos de acrossoma representaram de 0 a 7% entre touros.

O sêmen colhido por eletroejaculação (EEJ) apresentou médias de motilidade total 85%, vigor 5, percentual de espermatozóides morfologicamente deformados de 8,2% sendo que destes, somente 2,6% representaram defeitos de acrossoma. Na avaliação dos espermatozóides colhidos da cauda do epidídimo, pode-se observar que a motilidade espermática não apresentou queda significativa até 24 horas de armazenamento, não apresentando diferença ( $p>0,05$ ) entre o G6, G12, G18 e G24, porém houve uma redução significativa para o G30 em comparação aos demais grupos. Na avaliação comparativa dos espermatozóides do ejaculado e do epidídimo de touros pode-se observar que a motilidade espermática foi significativamente superior ( $p<0,05$ ) para os espermatozóides do ejaculado (Tabela 2).

O vigor espermático apresentou uma queda pouco expressiva para o G18, G24 e G30 em relação aos demais grupos. Nenhuma diferença significativa foi observada para anormalidades dos espermatozóides entre EEJ e G6 apresentando valores menores nesse parâmetro que G12, G18 e G24 que não diferiram entre si. O percentual de espermatozóides anormais foi significativamente maior no G30 que em EEJ, G6, G12 e G24 ( $p<0,05$ ).

O defeito morfológico encontrado com maior frequência nos espermatozoides colhidos da cauda do epidídimo foi representado pela presença de gotas citoplasmáticas (Figura 12).

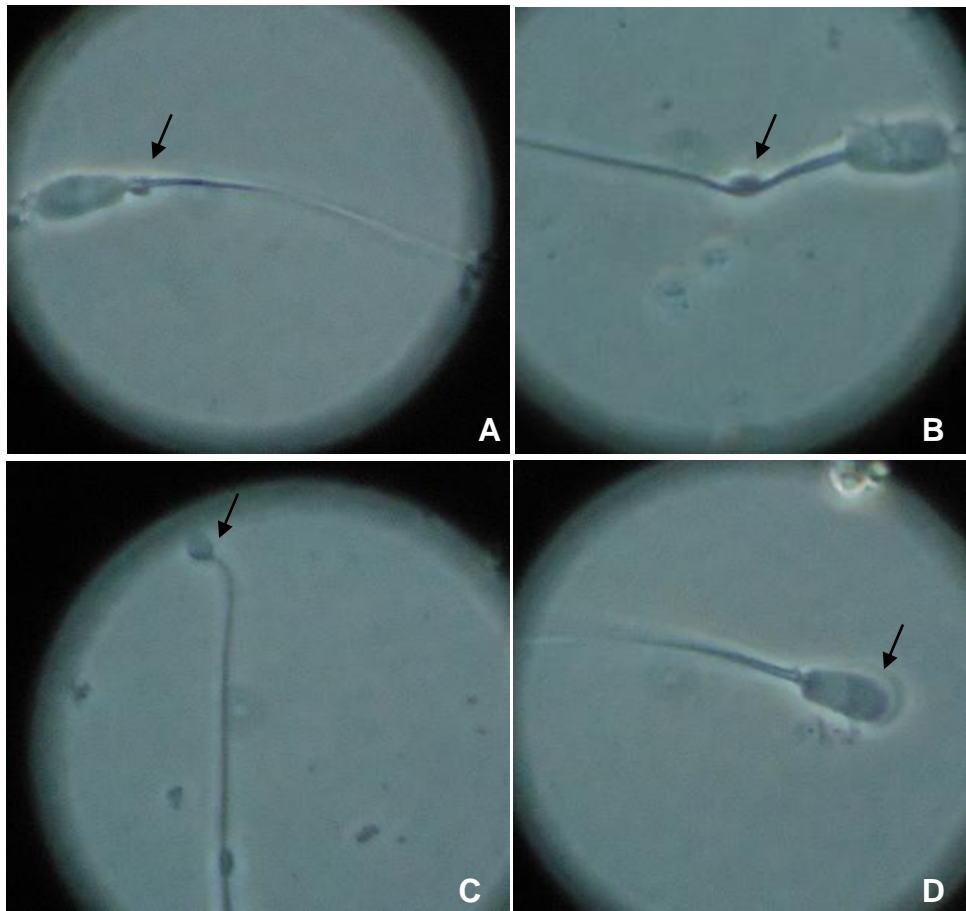


FIGURA 12- Morfologia dos espermatozoides do epidídimo de touros em microscopia de contraste de fase (aumento 1000x). A, gota citoplasmática proximal; B, gota citoplasmática em translocação; C, gota citoplasmática distal sendo liberada da porção final da cauda do espermatozóide; D, espermatozóide com acrossoma em deslocamento.

Ainda na tabela 2, podemos observar que o percentual de defeitos de acrossoma dos espermatozoides não apresentou diferença ( $p > 0,05$ ) entre os grupos EEJ, G6, G12, G18, G24 e G30, sendo rara a observação desse defeito morfológico nos células espermáticas do epidídimo e do ejaculado.

TABELA 2 - Valores médios e desvio padrão de motilidade, vigor, percentual de espermatozóides morfologicamente deformados (EMD) e defeitos de acrossoma dos espermatozóides colhidos da cauda do epidídimo (G6; G12; G18; G24; G30) e por eletroejaculação (EEJ) em touros Tabapuã.

Grupos (n=4)	Motilidade (%)	Vigor (0-5)	EMD (%)	Defeitos Acrossoma (%)
EEJ*	85 ± 5,7 <sup>a</sup>	5 ± 0 <sup>a</sup>	8,2 ± 3,9 <sup>a</sup>	2,6 ± 2,1 <sup>a</sup>
G6	67,5 ± 11,9 <sup>b</sup>	5 ± 0 <sup>a</sup>	9,5 ± 3,1 <sup>a</sup>	2 ± 1,1 <sup>a</sup>
G12	66,25 ± 7,5 <sup>b</sup>	5 ± 0 <sup>a</sup>	18 ± 3,9 <sup>b</sup>	2,25 ± 3,2 <sup>a</sup>
G18	67,5 ± 2,8 <sup>b</sup>	4,5 ± 1 <sup>b</sup>	21,25 ± 6,1 <sup>bc</sup>	3,75 ± 2,9 <sup>a</sup>
G24	58,75 ± 8,5 <sup>b</sup>	4,7 ± 0,5 <sup>b</sup>	19,5 ± 3,1 <sup>b</sup>	1,25 ± 1,5 <sup>a</sup>
G30	41,25 ± 7,5 <sup>c</sup>	4 ± 0 <sup>c</sup>	26,5 ± 3,1 <sup>c</sup>	3,5 ± 0,5 <sup>a</sup>

\*Para o grupo EEJ o n=10

Valores seguidos por letras diferentes na mesma coluna diferem entre si (p<0,05).

Em relação à concentração espermática os valores encontrados foram bem variados entre os grupos, não evidenciando relação entre número de espermatozóides recuperados e o tempo de coleta (Tabela 3). A concentração por mL não diferiu entre os grupos EEJ, G12 e G18, que apresentaram valores significativamente superiores que o G6, G24 e G30. O número total de espermatozóides recuperados não diferiu entre o grupo de eletroejaculação (EEJ) e o G6, G24 e G30. Quando avaliamos os grupos G12 e G18 observamos que estes apresentam um número significativamente superior (p<0,05) de espermatozóides recuperados no total que os demais.

O maior valor médio foi de 426,875 milhões de espermatozóides por mL, observado no grupo G12, e 8,53 bilhões de espermatozóides recuperados em média da cauda de apenas um dos epidídimos.

TABELA 3 - Valores médios de concentração por mL, volume da amostra e número total de espermatozoides colhidos da cauda do epidídimo (G6; G12; G18; G24; G30) e por eletroejaculação (EEJ) em touros Tabapuã.

Grupos (n=4)	Concentração (milhões/mL)	Volume da amostra (mL)	Número total de espermatozoides (milhões)
EEJ*	568,5 <sup>a</sup>	5,5	3155,1 <sup>a</sup>
G6	189,375 <sup>b</sup>	20	3787,5 <sup>a</sup>
G12	426,875 <sup>a</sup>	20	8537,5 <sup>c</sup>
G18	321,25 <sup>a</sup>	20	6425,0 <sup>bc</sup>
G24	181,875 <sup>b</sup>	20	3637,5 <sup>ab</sup>
G30	101,813 <sup>b</sup>	20	2036,25 <sup>a</sup>

\* Para o grupo EEJ o n=10

Valores seguidos por letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ( $p < 0,05$ ).

Na tabela 4 são apresentados os valores comparativos entre os lados direito e esquerdo do testículo e epidídimo quanto ao peso e o número total de espermatozoides recuperados. Podemos verificar que não há diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre a média de peso das estruturas do lado direito e esquerdo e seu respectivo número de espermatozoides recuperados.

TABELA 4 - Média e desvio padrão dos valores comparativos entre o peso do testículo, o peso do epidídimo, o peso total (peso testículo + epidídimo), e o número total de espermatozoides recuperados (NTE) do epidídimo de touros Tabapuã.

n=10	Peso testículo (g)	Peso epidídimo (g)	Peso testículo + epidídimo (g)	NTE (bilhões)
Direito	275 ± 93,8 <sup>a</sup>	34,7 ± 9,9 <sup>a</sup>	311,8 ± 104 <sup>a</sup>	4,89 ± 3,8 <sup>a</sup>
Esquerdo	265 ± 94 <sup>a</sup>	33,7 ± 10 <sup>a</sup>	300,3 ± 104 <sup>a</sup>	4,87 ± 2,7 <sup>a</sup>

NTE= número total de espermatozoides recuperados

Valores seguidos por letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ( $p < 0,05$ )

Ao avaliar o número total de espermatozoides do epidídimo, ou seja, o somatório dos espermatozoides recuperados do epidídimo direito mais esquerdo, obteve-se em média  $9,58 \pm 5$  bilhões de células espermáticas. Esse valor foi significativamente superior ( $p < 0,05$ ) que a contagem média de espermatozoides colhidos por eletroejaculação ( $3,21 \pm 2,4$  bilhões) dos mesmos animais. Não houve

diferença entre a média total de espermatozóides colhidos do epidídimo direito com os colhidos do epidídimo esquerdo (Figura 13).

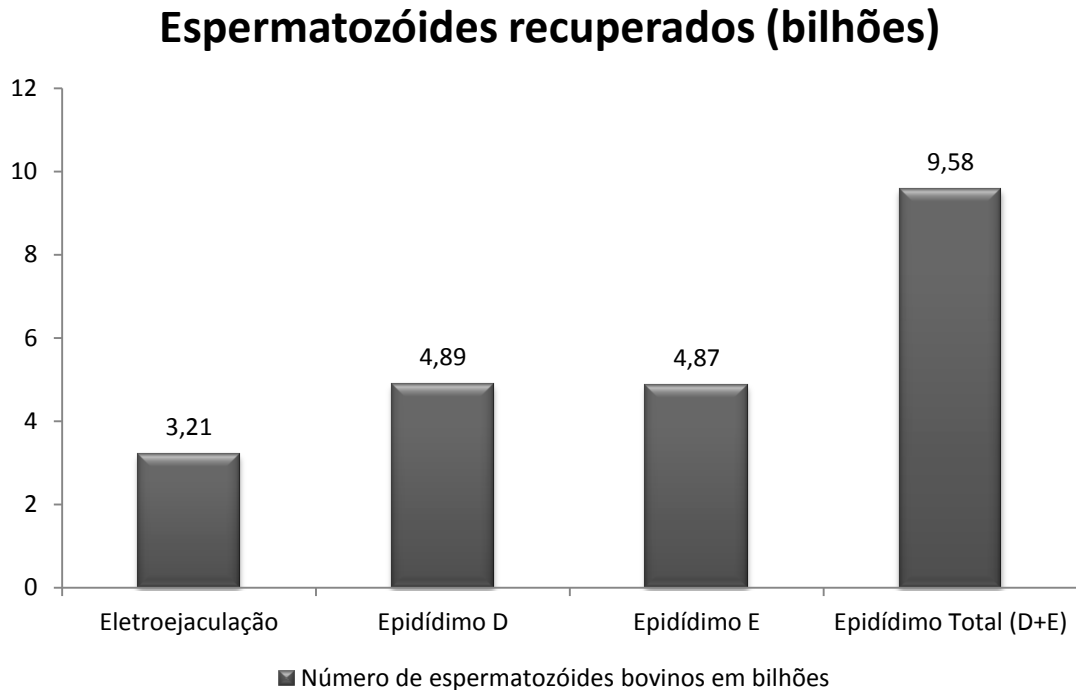


FIGURA 13 - Valor médio do número de espermatozóides recuperados por eletroejaculação, dos epidídimos direitos (Epidídimo D), dos epidídimos esquerdos (Epidídimo E), e da soma dos epidídimos direitos e esquerdos (Epidídimo total (D+E)) de touros Tabapuã.

Com a refrigeração do sêmen em 5°C, os espermatozóides do epidídimo se mantiveram viáveis em média de 15 a 36 horas pós-coleta, e os do ejaculado por 40,8 horas (Tabela 5). Mesmo não havendo diferença significativa entre os grupos ( $p>0,05$ ) podemos observar que há uma tendência do G30 apresentar uma resistência menor a 5°C.

TABELA 5 - Tempo em horas em que os grupos foram mantidos em temperatura ambiente, média e desvios padrão do tempo de resistência a 5°C e tempo total desde a orquiectomia até motilidade  $\geq 30\%$ , em touros Tabapuã.

Grupos n=2	Temperatura ambiente (h)	Tempo de resistência 5°C (h)	Tempo total (h)
EEJ*	0	40,8 $\pm$ 22,2 <sup>a</sup>	40,8
G6	6	27 $\pm$ 21,2 <sup>a</sup>	33
G12	12	21 $\pm$ 4,4 <sup>a</sup>	33
G18	18	30 $\pm$ 8,4 <sup>a</sup>	48
G24	24	36 $\pm$ 25,4 <sup>a</sup>	60
G30	30	15 $\pm$ 4,2 <sup>a</sup>	45

\*Para o grupo EEJ o n=10

Valores seguidos por letras iguais na mesma coluna não diferem entre si ( $p>0,05$ )

## 6.4 DISCUSSÃO

Sabe-se que os gametas assim como o corpo dos animais degeneram rapidamente após a morte e as condições de tempo e temperatura pela qual os epidídimos são expostos influenciam diretamente na viabilidade espermática (KAABI et al., 2003).

Nesse estudo a motilidade espermática foi o parâmetro mais afetado pelo tempo pós-orquiectomia (Tabela 2). Estudos anteriores em diferentes espécies (YU e LEIBO, 2002; KAABI et al., 2003; MARTINEZ-PASTOR et al., 2005; MURADÁS et al., 2006) relatam que a motilidade espermática é o primeiro parâmetro a ser afetado pelo tempo *post-mortem* antes que as alterações morfológicas. Isso se deve ao fato de que quanto maior for o tempo *post-mortem*, maior é a velocidade de decomposição dos tecidos e de degradação dos espermatozóides (SONGSASEN et al., 1998; TITTARELI et al., 2006). O grupo que permaneceu por mais tempo armazenado em temperatura ambiente (G30) pós-orquiectomia apresentou a menor porcentagem de espermatozóides móveis.

Os espermatozóides coletados da cauda do epidídimo dos touros não apresentaram queda significativa na motilidade espermática até 24 horas de armazenamento em temperatura ambiente, demonstrando que desde 6 horas até 24 horas após a morte do touro, a motilidade espermática não sofrerá alteração. Em outras espécies como carneiros (KAABI et al., 2003) e garanhões (MURADÁS et al., 2006) isso já foi descrito. Entretanto, Toyonaga et al., (2011) relatam que a motilidade espermática reduz significativamente em 24 horas de armazenamento quando trabalha-se com epidídimos de gatos domésticos em temperatura atmosférica. Apesar do G30 apresentar queda significativa na motilidade ( $p < 0,05$ ) em comparação aos demais grupos, ainda sim foi recuperada uma quantidade considerável (41,25%) de espermatozóides móveis (Tabela 2). Isso revela uma descoberta promissora que, mesmo depois de 30 horas após a castração ainda é possível recuperar uma boa quantidade de espermatozoides móveis de epidídimos de touros em condições de temperatura ambiente. Considerando uma motilidade de 41,25% num total de 2036,25 milhões espermatozóides recuperados no G30, obtivemos 839,95 milhões de espermatozóides viáveis, isso representa aproximadamente 84 doses de sêmen (10 milhões de espermatozóides viáveis por

dose) que poderão ser utilizadas em protocolos de inseminação artificial, para emprenhar vacas de um reprodutor após a morte ou após a castração.

Estudos que utilizaram o armazenamento em refrigeração de epidídimos de cervídeos selvagens (SOLER et al., 2005), touros (MARTINS et al., 2009) e carneiros (TAMAYO-CANUL et al., 2011) relatam que essa queda significativa ocorre somente após 48 quando os epidídimos são armazenados a 5°C, isso porque baixas temperaturas prolongam a viabilidade por redução no metabolismo espermático e redução das alterações autolíticas.

Na Tabela 2, quando comparamos os espermatozóides do epidídimo com os colhidos por eletroejaculação, observamos que a motilidade espermática foi maior ( $p < 0,05$ ) para os espermatozóides do ejaculado assim como descrito por Silva et al. (2003) e Goovaerts et al. (2006). No presente estudo os espermatozóides não foram extraídos da cauda do epidídimo imediatamente após a orquiectomia e sim no decorrer de várias horas, o que pode ter influenciado de maneira negativa esse parâmetro, além disso, os espermatozóides obtidos diretamente do epidídimo não entram em contato com o plasma seminal que é rico em substâncias benéficas as células espermáticas.

O vigor espermático apresentou uma pequena, porém significativa ( $p < 0,05$ ) redução a partir de 18 horas de armazenamento (G18) e também no G30. Como o vigor espermático está intimamente relacionado à motilidade podemos entender que o tempo de armazenamento também interfere nesse parâmetro. Entretanto os valores encontrados (Tabela 2) demonstram que mesmo depois de 30 horas de armazenamento as células espermáticas ainda estavam movendo-se de forma progressiva e em alta velocidade. O diluente utilizado para extrair os espermatozóides do epidídimo segundo especificações do fabricante possui na sua composição substâncias responsáveis pela ativação da movimentação dos espermatozóides, o que possivelmente conferiu um alto valor de vigor espermático.

Quando analisamos a morfologia espermática o defeito morfológico encontrado com maior frequência foi representado pela presença de gotas citoplasmáticas distais inerentes ao sêmen coletado diretamente do epidídimo (BARTH e OKO, 1989; COSTA et al., 2011) não representando um prejuízo a fertilidade. Espermatozóides com um grande número de gotas citoplasmáticas



distais tendem a perdê-las depois de 15 a 30 minutos de incubação em banho-maria ou depois da agitação do sêmen (BARTH e OKO, 1989). Isso explica porque nossas amostras não apresentaram um número elevado de gotas distais uma vez que os espermatozoides foram mantidos em banho-maria a 29°C por uma hora antes da avaliação. Dados da tabela 2 revelam que o G6 não diferiu do EEJ em relação às alterações morfológicas, como o G6 ficou menos tempo sob armazenamento preservando a morfologia dos espermatozoides, além da perda das gotas citoplasmáticas distais que aproximou os valores. O G12, G18 e G24 não diferiram ( $p>0,05$ ) entre si no percentual de defeitos morfológicos apresentando em torno de 20% de defeitos totais (Tabela 2), sendo que destes a grande maioria era representado pela presença de gotas citoplasmáticas citadas anteriormente ou defeitos de cauda, corroborando com outros estudos envolvendo espermatozoides de epidídimos de touros (SILVA et al., 2003; GOOVAERTS et al., 2006; MARTINS et al., 2009). O G30 apresentou um alto percentual ( $p<0,05$ ) de defeitos morfológicos diferindo dos demais grupos, possivelmente porque esse grupo permaneceu por mais tempo armazenado em temperatura ambiente o que gerou maior estresse às células espermáticas refletindo na morfologia. Ainda assim os valores encontrados para todos os grupos são inferiores a 30% que é valor máximo permitido para utilização do sêmen de touros (CBRA, 1998).

Não houve, em nenhum grupo alta porcentagem de lesões em acrossoma não sendo observada diferença significativa ( $p>0,05$ ) entre todos os grupos para esse parâmetro (Tabela 2). Como todos os epidídimos foram mantidos em temperatura entre 18 e 20°C não houve queda brusca de temperatura desse modo os gametas não sofreram injúrias decorrentes do congelamento, estresse osmótico, estresse oxidativo ou choque térmico que pudesse causar lesões nas membranas acrossomais (CRITSER e MOBRATEN, 2000). Nossos resultados são semelhantes aos de Muradás et al. (2006) em garanhões que não observaram alterações nos acrossomas entre os espermatozoides do epidídimo em diferentes tempos de coleta e do ejaculado, quando mantidos em temperatura ambiente.

Na tabela 3, os dados apresentados de concentração espermática revelam que a concentração média obtida por epidídimo não apresenta relação direta com o tempo de armazenamento do órgão e sim com a eficácia do método de coleta e o tamanho dos testículos dos animais. Touros aleatoriamente alocados no G12

possuíam maior idade que os demais e, em consequência, maior circunferência escrotal o que reflete em uma maior produção de espermatozóides (SILVA et al., 2002) elevando a média nesse grupo. Quanto ao método de fluxo retrógrado para extração dos espermatozóides aplicado no presente trabalho, apesar de demorado e trabalhoso, permitiu a obtenção de amostras com boa qualidade e livres de contaminação por células teciduais e sanguíneas, sendo a técnica mais indicada para recuperação de espermatozóides do epidídimo de touros. As concentrações médias obtidas por nós foram similares as encontradas por Turri et al. (2011) ( $294.41.10^6$  espermatozóides/mL), quando utilizou a técnica de fluxo retrógrado. Entretanto, em um estudo que utilizou a técnica de incisar a cauda do epidídimo, a concentração encontrada de  $432 \pm 77$  espermatozóides/mL foi bastante baixa (MARTINS et al., 2009) em relação aos nossos resultados. Cada milímetro da cauda do epidídimo contém uma quantidade grande de células espermáticas e a coleta ineficiente produz alterações expressivas nos resultados.

Na tabela 4 são feitas comparações entre os testículos e epidídimos direito e esquerdo em relação ao peso e ao número total de espermatozóides recuperados. Não foram detectadas diferenças entre os dois lados para todos os parâmetros ( $p > 0,05$ ) sugerindo que os dois testículos mantêm uma produção constante de gametas e as duas caudas dos epidídimos de um animal armazenam quantidades similares de espermatozóides para compor o ejaculado, sendo contrária a descrita por Goovaerts et al., (2006) que destacam diferenças entre os dois testículos e epidídimos dos mesmos touros.

Na figura 13, o gráfico representa que o número total de espermatozóides recuperados dos dois epidídimos juntos é significativamente superior ( $p < 0,05$ ) aos recuperados por eletroejaculação, caracterizando a cauda do epidídimo como um local de armazenamento de gametas assim como estabelecido em estudos anteriores (BEDFORD, 1994; JHONSON et al., 2000; GRANEMANN et al., 2005), ratificando que em cada ejaculação é liberada apenas uma parcela dos espermatozóides epididimais.

Dados da tabela 5 demonstram que o efeito predominante da conservação a  $5^{\circ}\text{C}$  foi o prolongamento da sobrevivência espermática em decorrência da redução na taxa metabólica dos espermatozóides (VISHWANATH e SHANNON, 2000). O

tempo necessário para que houvesse queda na motilidade espermática variou entre os grupos, que apresentaram elevados desvios padrões caracterizando variações individuais acentuadas. Os espermatozoides não são adaptados para sobreviver em baixas temperaturas, portanto tem respostas variáveis ao resfriamento dependendo do indivíduo e da espécie (HOLT, 2000a).

Os espermatozoides do ejaculado apresentaram resistência média de 40,8 horas em 5°C. O G24 apresentou uma durabilidade maior que os demais, possivelmente pelo efeito individual de um touro que produziu espermatozoides resistentes a queda de temperatura e pode ser considerado como “bom” resfriador de sêmen (WATSON, 2000). Existem diferenças consistentes na qualidade do sêmen e na sobrevivência espermática após estresse térmico entre machos individualmente (HOLT, 2000b). Essa variação individual já foi descrita em diversas espécies (HERNANDÉZ et al., 2007; AURICH, 2008; MEDRANO et al., 2010), e em bovinos pode ser chama de “efeito touro”.

Em vista dos resultados encontrados nós indicamos o uso dos procedimentos descritos nesse estudo em casos de morte inesperada de reprodutores de alto valor genético quando a carcaça for exposta a uma temperatura entre 18 e 20°C.

## 6.5 CONCLUSÃO

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

- É possível recuperar espermatozóides viáveis da cauda do epidídimo de touros até 30 horas pós-orquiectomia com motilidade de 41,25% quando armazenados em temperatura ambiente de 18-20°C;
- A motilidade espermática é o parâmetro mais afetado pelo tempo pós-orquiectomia, seguido dos defeitos morfológicos e vigor espermático. Os defeitos de acrossoma não são influenciados não diferindo entre todos os grupos ( $p>0,05$ );
- A recuperação por fluxo retrógrado de espermatozóides da cauda do epidídimo permite à obtenção de um número significativamente superior ( $p<0,05$ ) a coleta de sêmen por eletroejaculação;
- Os espermatozóides do ejaculado diferem dos espermatozóides do epidídimo por apresentarem maior motilidade e vigor e menor percentual de defeitos morfológicos ( $p<0,05$ );
- O peso em gramas dos testículos e epidídimos e o número total de espermatozóides recuperados não diferem entre o lado direito e esquerdo ( $p>0,05$ );
- A manutenção do sêmen refrigerado (5°C) é uma alternativa viável para preservação temporária dos gametas colhidos da cauda do epidídimo de touros, mantendo-os viáveis com motilidade superior a 30% por 15 a 36 horas pós-coleta, e por 40,8 horas para aqueles colhidos por eletroejaculação.

## 6.6 REFERÊNCIAS

AURICH, C. Recent advances in cooled-semen technology. **Animal Reproduction Science**, v.107, p. 268-275, 2008.

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 human epididymis. **Human reproduction**, v.9, p. 2187-2199, 1994.

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

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

COSTA, P.M.; MARTINS, C.F.; FRANCO, V.O.; REZENDE, L.O.F.; SERENO, J.R.B.; CAMPOS, H.C.F. Nascimento de bezerros normais após inseminação artificial utilizando espermatozóides criopreservados obtidos de epidídimos refrigerados de bovinos após a morte. **Ciencia Rural**, v.4, n.5, p.869-874, 2011.

CRISTER, J.K.; MOBRATEN, L.E. Cryopreservation of murine spermatozoa. **ILAR Journal**, v.41, p.197-206, 2000.

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.

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**, v.66, n.2, p.323-330, 2006.

GRANEMANN, L.C.; WEISS, R.R.; KOZICKI, L.E.; MURADÁS, P.R.; TREML, T.E. Número total de espermatozóides 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, 2005.

HERNÁNDEZ, M.; ROCA, J.; GIL, M.A.; VÁZQUEZ, J.M; MARTÍNEZ, E.A. Adjustments on the cryopreservation conditions reduce the incidence of boar ejaculates with poor sperm freezability. **Theriogenology**, v.67, p.1436-1445, 2007.

HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.3-22, 2000a.

HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v.53, p.47-58, 2000b.

JOHNSON, L.; VARNER, D.D.; ROBERTS, M.E.; SMITH, T.L.; KEILLOR, G.E.; SCRUTCHFIELD, W.L. Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.471-480, 2000.

JONES, R. Sperm survival versus degradation in the mammalian epididymis: A hypothesis. **Biology of reproduction**, v.71, p.1405-1411, 2004.

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

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

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

MARTINS, C.F.; RUMPF, R.; PEREIRA, D.C.; DODE, M.N. Cryopreservation of epididymal bovine spermatozoa from dead animals and its uses *in vitro* embryo production. **Animal Reproduction Science**, v.101, p.326-331, 2007.

MEDRANO, A.; TERRAZAS, A.; SOTO, R. Principles and perspectives for the conservation of goat buck spermatozoa. **Small Ruminant Research**, v.89, p.140-143, 2010.

MONTEIRO, G.A.; PAPA, F.O.; ZAHN, F.S.; DELLAQUA JR., J.A.; MELO, C.M.; MAZIERO, R.R.D.; AVANZI, B.R.; ALVARENGA, M.A.; GUASTI, P.N. Cryopreservation and fertility of ejaculated and epididymal stallion sperm. **Animal Reproduction Science**, v.127, p.197-201, 2011.

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

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

RINGLEB, J.; WAURICH, R.; WIBBELT, J.; STREICH, W.J.; JEWGENOW, K. Prolonged storage of epididymal spermatozoa does not affect their capacity to fertilise *in vitro*-matured domestic cat (*Felis catus*) oocytes when using ICSI. **Reproduction, Fertility and Development**, v.23, n.6, p.818-825, 2011.

SANTIAGO-MORENO, J.; TOLEDANO-DÍAZ, A.; PULIDO-PASTOR, A.; GÓMEZ-BRUNET, A.; LÓPEZ-SEBASTIÁN, A. Birth of live Spanish ibex (*Capra pyrenaica hispanica*) derived from artificial insemination with epididymal spermatozoa retrieved after death. **Theriogenology**, v.66, p.283-291, 2006.

SILVA, A.E.D.F.; UNANIAN, M.M.; CORDEIRO, C.M.T.; FREITAS, A.R. de. Relação da Circunferência Escrotal e Parâmetros da Qualidade do Sêmen em Touros da Raça Nelore, PO. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.3, p.1157-1165, 2002.

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

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

SONGSASEN, N.; TONG, J.; LEIBO, S.P. 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.

TAMAYO-CANUL, J.; ÁLVAREZ, M.; MATA-CAMPUZANO, M.; ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ, M.; DE PAZ, P.; ANEL, L.; MARTÍNEZ-PASTOR, F. Effect of storage method and extender osmolality in the quality of cryopreserved epididymal ram spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.129, p.188-199, 2011.

TITTARELLI, C.; SAVIGNONE, C. A.; ARNAUDÍN, E.; STORNELLI, M. C.; STORNELLI, M.A.; DE LA SOTA, R.L. Effect of storage media and storage time on survival of spermatozoa recovered from canine and feline epididymides. **Theriogenology**, v.66, n.6, p.1637-1640, 2006.

TOYONAGA, M.; KAIHARA, A.; TSUTSUI, T. The Quality of Cryopreserved Sperm Collected from Feline Caudal Epididymides Stored at Room Temperature. **The Journal of Veterinary Medical Science**. v.73, n.10, p.1395-1398, 2011.

TURRI, F.; MADEDDU, M.; GLIOZZI, T.M.; GANDINI, G.; PIZZI, F. Influence of recovery methods and extenders on bull epididymal spermatozoa quality. **Reproduction in Domestic Animals**, 2011, article in press.

VISHWANATH, R; SHANNON, P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. **Animal Reproductions Science**, v.62, p.23-53, 2000.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with criopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.481-492, 2000.

WEISS, R.R.; MURADÁS, P.R.; GRANEMANN, L.C.; MEIRA, C. Freezing sperm from cauda epididymis of castrated stallions. **Animal Reproduction Science**, v.107, p.356, 2008. Abstract.

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



## 7. ANEXOS

### 7.1 Solução formol-salina tamponada (HANCOCK, 1957)

#### Solução estoque de NaCl

NaCl	9,01g
Água destilada	500 mL

#### Solução estoque tampão

##### Solução 1

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	21,68g
Água destilada	500 mL

##### Solução 2

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	11,13g
Água destilada	500 mL

#### Solução tampão final

Adicionar 200 mL da solução 1 em 80 mL da solução 2

#### Solução formol-salina

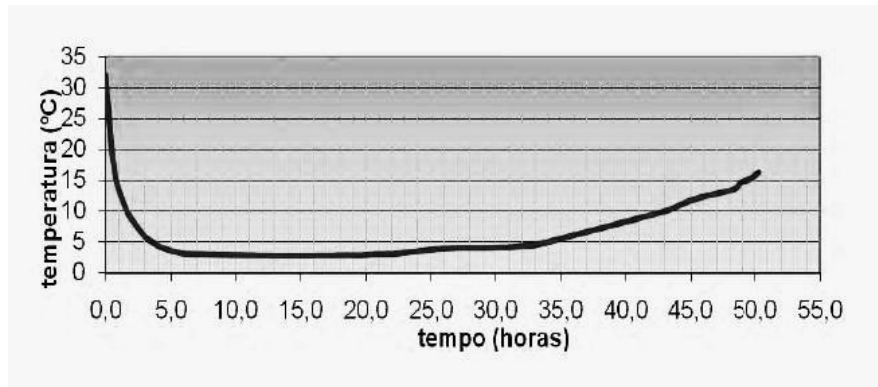
Solução estoque de NaCl	150 mL
Solução estoque tampão	100 mL
Formaldeído 40%	62,5 mL
Água destilada	500 mL

### 7.2 Composição do sal mineral FOSBOVI 30 (Tortuga)

Níveis de Garantia: (por kg do produto)

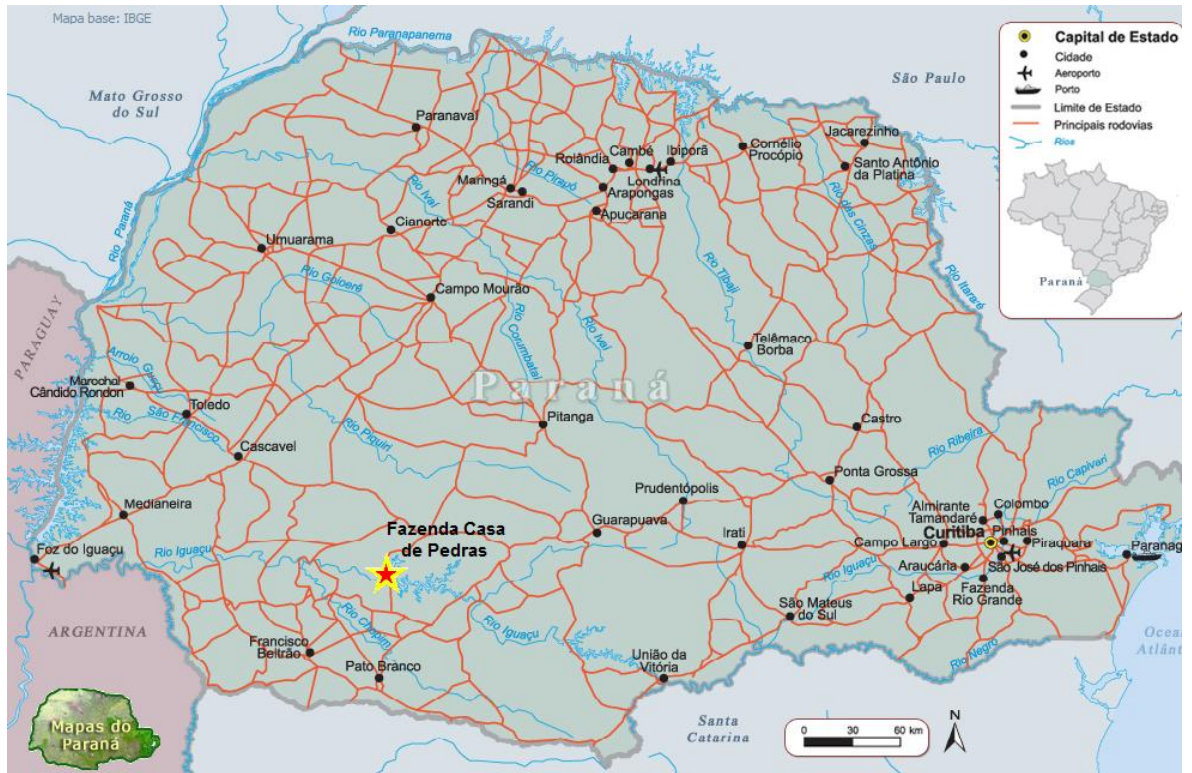
Cálcio	180,00g
Iodo	90,00mg
Fósforo	130,00g
Manganês	2.000,00mg
Zinco	5.270,00mg
Cobalto	100,00Mg
Flúor (máx.)	1.300,00mg
Cobre	1.250,00mg
Ferro	2.200,00Mg
Selênio	15,00Mg

### 7.3 Curva de refrigeração do container Botutainer<sup>®</sup> utilizado para manutenção do sêmen bovino



Fonte: CRESPILO, A.M. Estudo comparativo de diferentes metodologias de preservação do sêmen bovino para a utilização em programas de inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Botucatu, 2010. 114p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

## 7.4 Localização da Fazenda Casa de Pedras



Fonte: Mapas do Paraná, Disponível em: < <http://www.guiageo-parana.com/mapas.htm>>. Acesso em 20 de janeiro de 2012.

## 7.5 Vista aérea Fazenda Casa de Pedras



Fonte: Google earth, 2012.

## 7.6 Fotos



Touro Tabapuã selecionado para o experimento  
Fonte: Foto do Autor, 2011.



Introdução de tubo flexível no óstio prepucial para higienização pré-coleta de sêmen por eletroejaculação em touro Tabapuã.  
Fonte: Foto do Autor, 2011



Laboratório montado na Fazenda Casa de Pedras para avaliações e análises.  
Fonte: Foto do Autor, 2011