

LUIS CARLOS GRANEMANN

**AVALIAÇÃO COMPARATIVA DO SÊMEN EQÜINO COLHIDO COM VAGINA
ARTIFICIAL E POR LAVADO INTRALUMINAL DA CAUDA DO EPIDÍDIMO
PÓS-ORQUIECTOMIA**

CURITIBA

2006

LUIS CARLOS GRANEMANN

**AVALIAÇÃO COMPARATIVA DO SÊMEN EQÜINO COLHIDO COM VAGINA
ARTIFICIAL E POR LAVADO INTRALUMINAL DA CAUDA DO EPIDÍDIMO
PÓS-ORQUIECTOMIA**

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

Orientador: Prof. Dr. Romildo R. Weiss

CURITIBA

2006

Dedico este trabalho aos meus pais, Alfredo e Dorilda, e ao meu avô Luiz (*in memoriam*), que apoiaram e incentivaram a realização de meus sonhos.

AGRADEÇO...

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

À minha família, em especial aos meus pais Alfredo e Dorilda, pelo apoio e confiança.

À minha namorada, Cheila, pelo amor, carinho e apoio nos momentos bons e ruins.

Ao professor, orientador e amigo Romildo R. Weiss, pela oportunidade, confiança e dedicação para a realização deste sonho.

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

A colega e Médica Veterinária Priscila, com a qual partilhei todas as alegrias, tristezas e dificuldades da parceria para a realização desse projeto.

Ao colega Fábio da Cunha pela ajuda e esclarecimento das dúvidas.

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

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. LITERATURA	3
2.1 ESPERMATOGÊNESE E MATURAÇÃO DOS ESPERMATOZÓIDES	3
2.2 COLHEITA DE ESPERMATOZÓIDES DO EPIDÍDIMO	7
2.3 AVALIAÇÃO DO SÊMEN	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 LOCAL	14
3.2 ANIMAIS	14
3.3 COLHEITA DE SÊMEN COM VAGINA ARTIFICIAL	15
3.4 AVALIAÇÃO DO SÊMEN RECÉM-COLHIDO	15
3.5 ORQUIECTOMIA EQUINA.....	17
3.6 TÉCNICA DE COLHEITA DOS ESPERMATOZÓIDES DA CAUDA DO EPIDÍDIMO	18
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	22
4. RESULTADOS	24
4.1 AVALIAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA DO SÊMEN COLHIDO COM VAGINA ARTIFICIAL	24
4.2 AVALIAÇÃO COMPARATIVA DO SÊMEN COLHIDO COM VAGINA ARTIFICIAL E DOS ESPERMATOZÓIDES COLHIDOS DA CAUDA DO EPIDÍDIMO DOS GARANHÕES.....	25
4.2.1 Motilidade e Vigor.....	25
4.2.2 Número Total de Espermatozóides.....	30
4.2.3 Espermatozóides Morfologicamente Deformados e Defeitos de Acrossoma ..	33
5. DISCUSSÃO	36
5.1 COLHEITA DOS ESPERMATOZÓIDES EPIDIDIMAIS	36
5.2 MOTILIDADE E VIGOR.....	37
5.3 NÚMERO TOTAL DE ESPERMATOZÓIDES RECUPERADOS.....	39

5.4	ESPERMATOZÓIDES MORFOLOGICAMENTE DEFORMADOS E DEFEITOS DE ACROSSOMA	40
6.	CONCLUSÃO	42
	APÊNDICES	43
	REFERÊNCIAS	44

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - IDENTIFICAÇÃO DA RAÇA E IDADE DOS ANIMAIS UTILIZADOS NO EXPERIMENTO	14
TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS DO SÊMEN COLHIDO COM VAGINA ARTIFICIAL DOS GARANHÕES	25
TABELA 3 - AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA MOTILIDADE E VIGOR DOS ESPERMATOZÓIDES COLHIDOS COM VAGINA ARTIFICIAL E DA CAUDA DO EPIDÍDIMO DOS GARANHÕES EM FUNÇÃO DO TEMPO	26
TABELA 4 - AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA MOTILIDADE E VIGOR DOS ESPERMATOZÓIDES DOS GARANHÕES NO MOMENTO DA COLHEITA DA CAUDA DO EPIDÍDIMO (0 HORA) E UMA HORA APÓS A COLHEITA (1 HORA)	28
TABELA 5 - COMPARAÇÃO DO NÚMERO TOTAL DE ESPERMATOZÓIDES (BILHÕES) COLHIDOS COM A VAGINA ARTIFICIAL E DA CAUDA DO EPIDÍDIMO DOS GARANHÕES.....	30
TABELA 6 - COMPARAÇÃO DA MÉDIA DO NÚMERO TOTAL DE ESPERMATOZÓIDES (BILHÕES) COLHIDOS COM A VAGINA ARTIFICIAL E DA CAUDA DO EPIDÍDIMO DOS GARANHÕES.....	31
TABELA 7 - AVALIAÇÃO COMPARATIVA DO PORCENTUAL DE ESPERMATOZÓIDES MORFOLOGICAMENTE DEFORMADOS (EMD) E DE DEFEITOS DE ACROSSOMA (DA).....	34

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - FOTOS DE ALGUNS ANIMAIS UTILIZADOS NO EXPERIMENTO ...	15
FIGURA 2 - COMPLEXO TESTÍCULO-CAUDA DO EPIDÍDIMO DO GARANHÃO SEPARADOS.....	19
FIGURA 3 - TECIDO CONECTIVO QUE RECOBRE A CAUDA DO EPIDÍDIMO DO GARANHÃO.....	20
FIGURA 4 - DISSECAÇÃO DA CAUDA DO EPIDÍDIMO DO GARANHÃO.....	20
FIGURA 5 - TAMANHO DE UM SEGMENTO DISSECADO DA CAUDA DO EPIDÍDIMO DO GARANHÃO.....	21
FIGURA 6 - LAVAGEM DE UM SEGMENTO DA CAUDA DO EPIDÍDIMO DE GARANHÃO	22
FIGURA 7 - AVALIAÇÃO DO DECRÉSCIMO DA MOTILIDADE (%) DOS ESPERMATOZÓIDES COLHIDOS DA CAUDA DO EPIDÍDIMO DOS GARANHÕES EM FUNÇÃO DO TEMPO PÓS-ORQUIECTMIA.....	27
FIGURA 8 - AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA MOTILIDADE (%) NO MOMENTO DA COLHEITA DOS ESPERMATOZÓIDES DA CAUDA DO EPIDÍDIMO DOS GARANHÕES (INICIAL) E UMA HORA APÓS (1 HORA)	29
FIGURA 9 - AVALIAÇÃO COMPARATIVA DO VIGOR NO MOMENTO DA COLHEITA DOS ESPERMATOZÓIDES DA CAUDA DO EPIDÍDIMO DOS GARANHÕES (INICIAL) E UMA HORA APÓS (1 HORA).....	29
FIGURA 10 - COMPARAÇÃO DO NÚMERO TOTAL DE ESPERMATOZÓIDES (BILHÕES) COLHIDOS COM A VAGINA ARTIFICIAL E DA CAUDA DO EPIDÍDIMO DOS GARANHÕES.....	32
FIGURA 11 - COMPARAÇÃO DO NÚMERO TOTAL DE ESPERMATOZÓIDES (BILHÕES) COLHIDOS DA CAUDA DO EPIDÍDIMO ESQUERDO E DIREITO DOS GARANHÕES	32
FIGURA 12 - AVALIAÇÃO COMPARATIVA DO PORCENTUAL DE ESPERMATOZÓIDES MORFOLOGICAMENTE DEFORMADOS (EMD) E DE DEFEITOS DE ACROSSOMA (DA) EM FUNÇÃO DO TEMPO PÓS-ORQUIECTOMIA DOS GARANHÕES.....	35

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a diminuição da viabilidade das células espermáticas colhidas da cauda do epidídimo de garanhões em função do tempo pós-orquiectomia (6-30 horas) comparando-os com os espermatozóides colhidos com vagina artificial. Após orquiectomia os testículos foram armazenados a temperatura ambiente (18-25°C). Os espermatozóides epididimais foram obtidos através de dissecação da cauda do epidídimo e lavagem com diluente Botu-Crio®, e submetidos à avaliação de motilidade, vigor, número total de espermatozóides, alterações totais e de acrossoma, sendo estes parâmetros comparados com os espermatozóides colhidos com vagina artificial. A motilidade e vigor diminuíram significativamente 12 horas pós-orquiectomia, o número total de espermatozóides recuperados do epidídimo foi significativamente superior aos colhidos com a vagina artificial. Os espermatozóides morfológicamente deformados e com defeitos de acrossoma tiveram aumento significativo após 18 e 24 horas respectivamente. A colheita de espermatozóides da cauda do epidídimo mostrou-se viável por até 24 horas após a orquiectomia dos animais.

Palavras-chave: espermatozóide, epidídimo, garanhão

ABSTRACT

The main purpose of this study was to evaluate decreased viability of spermatid cell collected from the epididymal tail of stallions concerning post-orchietomy period (6 – 30 hours) compared to sperm collected through artificial vagina. Following orchietomy, testes were stored at room temperature (18 – 25°C). Epididymal sperms have been obtained through dissection of epididymal tail and washing with diluent Botu-Crio®, and submitted to motility, strength, total number of sperms, overall and acrosome total changes evaluation, being that these parameters compared to artificial vagina-collected sperms. Motility and strength significantly decreased 12 hours post-orchietomy, the total number of epididymal recovered sperms was significantly higher than the ones collected through artificial vagina. Sperms showing morphological malformation and acrosome defective significantly increased after 18 and 24 hours, respectively. The epididymal tail sperm collection has shown to be viable up to 24 hours post-orchietomy.

Key-words: sperm, epididymis, stallion.

1. INTRODUÇÃO

A primeira inseminação artificial realizada na espécie eqüina ocorreu aproximadamente em 1322 a.C., quando um chefe árabe, usou de artifícios, impregnando um chumaço de algodão com as secreções de uma égua em cio. Aproximando-se do melhor garanhão da tribo rival, conseguiu excitá-lo com as secreções da fêmea e obteve uma ejaculação. O sêmen foi colhido sobre outro chumaço de algodão, o qual, foi introduzido na vagina de uma égua no estro, ocorrendo posteriormente o nascimento de um potro.

O reprodutor, como um dos fatores imprescindíveis na cadeia da produção animal, deve apresentar eficiente potencial de fertilidade “*in vitro*” e “*in vivo*”, que varia de indivíduo para indivíduo em função da qualidade do sêmen (BARTH e OKO, 1989).

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

A morte inesperada de animais de alto valor genético ou até mesmo de animais sem mérito genético, mas com interesse em preservar ou dar continuidade a sua genética, pode ocorrer em todas as espécies e em todos os tipos de criações, desde as mais simples até as mais tecnificadas. É importante saber que animais podem ir a óbito inesperadamente e longe dos laboratórios onde as amostras de sêmen podem ser processadas e armazenadas.

Os eqüinos possuem grande fragilidade do trato gastrointestinal, sendo este um dos principais fatores que podem levar os garanhões a óbito inesperadamente, além de que em sua maioria, apresentam um temperamento agressivo e, com isto, são predispostos a traumatismos e acidentes inesperados. Não só a morte pode comprometer a vida reprodutiva de um animal, mas acidentes, que impossibilitem a realização da cópula ou colheita de seu sêmen.

A recuperação pós-morte de espermatozóides viáveis do epidídimo é uma técnica importante para obter reservas genéticas de animais geneticamente valiosos ou de machos de espécies ameaçadas de extinção.

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

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

O presente experimento objetivou aperfeiçoar a técnica de colheita de espermatozoides da cauda do epidídimo de garanhão, avaliar e comparar o número total de espermatozoides colhidos e o decréscimo da viabilidade dos mesmos em função do tempo pós-orquiectomia, tendo como parâmetros para comparação o sêmen colhido com a vagina artificial, avaliado após a diluição em diluente.

2. LITERATURA

Para preservar a genética dos animais domésticos e futuras gerações de animais selvagens, faz-se necessário manter os animais vivos ou manter suas células germinativas, espermatozóides, oócitos e embriões criopreservados (KIKUCHI *et al.*, 1999).

Durante a década passada, observou-se o surgimento de diversas biotecnologias reprodutivas, algumas dessas biotecnologias já foram incorporadas na reprodução eqüina, outras ainda deverão ser incorporadas mais lentamente e algumas não serão incorporadas. Para que estas tecnologias sejam aceitas e utilizadas prontamente na atividade eqüina, elas dependem do sucesso da tecnologia, do comportamento dos criadores e veterinários e do custo benefício da tecnologia. Dentre as tecnologias pode-se citar a citometria de fluxo, a inseminação artificial com dose reduzida, a sexagem de espermatozóides, os avanços e aprimoramento das técnicas de congelamento de sêmen e injeção intracitoplasmática de espermatozóide (SQUIRES, 2005).

O processo de fusão e fecundação é uma conseqüência da perfeita interação de mensagens emitidas pelo germoplasma masculino e feminino para a formação do embrião. Mas para isso, é necessária a funcionalidade estrutural e bioquímica da célula desde a sua formação até a maturação, cujo processo é denominado espermatogênese (JOHNSON *et al.*, 2000).

2.1 ESPERMATOGÊNESE E MATURAÇÃO DOS ESPERMATOZÓIDES

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

Segundo JOHNSON *et al.* (1997) a espermatogênese é um longo, mas ordenado processo em que espermatozóides são produzidos nos túbulos seminíferos, e é dividida em três fases: a fase proliferativa em que a célula primária diplóide, a espermatogônia, passa por repetidas divisões mitóticas para dar origem

aos espermátocitos; a fase meiótica em que o material genético do espermátocito recombina e segrega para formar a célula haplóide redonda ou espermátide; e a fase espermiogênica em que a espermátide sofre a diferenciação que dará origem a espermátides alongadas, de núcleo condensado e flagelo espécie-específico, ou espermatozóide que será liberado para o epidídimo. Para que esta última fase ocorra, as espermátides sofrem uma série de transformações que incluem a formação do complexo de Golgi, da cabeça, do acrosoma e a aquisição da capacidade de fertilizar o ovócito.

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

A fase em que ocorrem as maiores transformações morfológicas (condensação, alongamento da forma) do núcleo e da membrana é a fase acrossômica. Esta fase é seguida da maturação do espermatozóide, em que se finaliza a forma da cabeça e condensação da cromatina, a formação da cauda e do pescoço, originando o espermatozóide (BARTH e OKO, 1989).

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

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

Os túbulos seminíferos constituem cerca de 70% do volume do testículo eqüino (JOHNSON, 1991). Estes são conectados à cabeça do epidídimo pela “*rete testis*”, formada por pequenos ductos eferentes dentro dos quais ocorre a absorção dos fluídos oriundos da “*rete testis*” e o aparecimento de secreções contendo

antígenos e proteínas, ambos necessários ao estabelecimento da motilidade espermática. Portanto, para alcançarem a cabeça do epidídimo os espermatozóides transitam pelos ductos eferentes, movimento este realizado com o auxílio das células epiteliais ciliadas e pela contração da musculatura lisa das paredes dos próprios ductos (BRANDT *et al.*, 1978).

A cromatina nuclear é definitivamente condensada durante o trânsito pelo epidídimo. Quando há alteração na estrutura nuclear por fatores mecânicos e químicos, há aumento na habilidade de fecundação e de manter o desenvolvimento embrionário. Portanto, tanto os eventos da espermatogênese quanto à maturação pós-testicular são necessários para a competência das células espermáticas (BEDFORD, 1994).

O espermatozóide liberado pelo testículo ao alcançar o epidídimo ainda não possui habilidade de se movimentar, de reconhecer e fecundar o ovócito, necessitando submeter-se a transformações ao longo do epidídimo para potencializar a função de formar o zigoto.

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

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

do epidídimo reflete a capacidade de armazenamento de espermatozóides do macho. Em touros e garanhões o número de espermatozóides armazenados na cauda do epidídimo pode ser suficiente para até 10 ejaculados sucessivos dependendo da idade, tamanho e atividade reprodutiva do animal (BEDFORD, 1994).

A maturação espermática é a função mais estudada do epidídimo. Trabalhos demonstram que espermatozóides coletados da cabeça do epidídimo são incapazes de fertilização quando usados para inseminação artificial ou fertilização *in vitro* (HORAN e BEDFORD, 1972). Na maioria das espécies, os espermatozóides têm que alcançar a porção final do corpo do epidídimo para adquirir potencial de fertilização. A aquisição da habilidade de fertilização durante o trânsito epididimal define o conceito de maturação espermática. Muitas características bioquímicas são modificadas durante o trânsito epididimal, incluindo a condensação da cromatina, trocas de fosfolípidos e colesterol, modificações na composição das proteínas da superfície da membrana plasmática (DACHEUX e PAQUIGNON, 1980).

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

O período de tempo para uma espermatogônia ser convertida em um espermatozóide incorporado dentro do lúmen do túbulo seminífero é de 55-57 dias no garanhão. Esse processo de liberação das espermátides no lúmen do túbulo seminífero é chamado de espermição. Aproximadamente 9 dias são necessários para o transporte dos espermatozóides através do sistema de ductos, conseqüentemente, uma população nova de espermatozóides pode ser ejaculada após 64-66 dias. Um ejaculado é, conseqüentemente, um composto dos eventos que ocorreram nos dois meses anteriores que influenciaram a espermatogênese quando os espermatozóides estavam sendo formados, e subseqüentemente o seu transporte e maturação através do sistema de ductos (AMANN, 1993; LOVE, 2002).

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

2.2 COLHEITA DE ESPERMATOZÓIDES DO EPIDÍDIMO

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

A recuperação pós-morte de espermatozoides epididimais é benéfica, principalmente, para as espécies com dificuldade para coletar seu sêmen *in vivo*, em animais ameaçados de extinção ou animais que podem ir a óbito inesperadamente. Recuperar e criopreservar espermatozoides epididimais pode ser benéfico para salvar o germoplasma desses animais (WILDT *et al.*, 1986).

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

Uma técnica similar consiste em fazer numerosos cortes na cauda do epidídimo e pressionar suavemente a cauda e coletar os espermatozoides por extravasamento (KAABI *et al.*, 2003). Outra possibilidade é usar uma agulha e perfurar os túbulos (BARTELS *et al.*, 2000). KISHIKAWA *et al.* (1999), utilizaram

pinças para comprimir a cauda do epidídimo de ratos e recuperar os espermatozóides.

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

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

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

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

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

MARTINEZ-PASTOR *et al.* (2005b), pesquisaram os efeitos do tempo pós-morte (até 4 dias) sobre os espermatozóides epididimais, resfriados a 5°C, de caprinos e observaram uma boa qualidade seminal (motilidade e defeitos espermáticos) por até 72 horas, permitindo o seu uso em programas de inseminação artificial.

KAABI *et al.* (2003), estudaram os efeitos do intervalo entre a morte do animal e a recuperação dos espermatozóides da cauda do epidídimo, armazenados à temperatura ambiente e a 5°C de carneiros (0, 24 e 48 horas), sobre a qualidade e capacidade de fertilização dos espermatozóides. Eles observaram que as amostras se mantiveram viáveis por até 24, 48 horas após a morte dos animais para os epidídimos armazenados a temperatura ambiente e resfriados respectivamente, entretanto a qualidade diminuía significativamente após esses períodos. Epidídimos armazenados a 5°C tinham melhor motilidade e menos formas anormais do que os armazenados a temperatura ambiente por mais de 24 horas. A capacidade de fertilização dos espermatozóides obtidos da cauda do epidídimo até 24 horas pós-morte foi semelhante a do ejaculado.

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

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

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

SAID *et al.* (2003), observaram que oócitos que receberam injeção intracitoplasmática de espermatozóides epididimais e de ejaculados de ratos, tiveram taxa de fertilização e desenvolvimento embrionário semelhantes.

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

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

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

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

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

MOORE e AKHONDI (1996), observaram que não existem diferenças nos parâmetros de motilidade dos espermatozóides recuperados de regiões equivalentes da cauda do epidídimo esquerdo e direito ou de diferentes regiões da cauda do epidídimo esquerdo e direito de ratos.

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

Espermatozóides epididimais de bovinos africanos podem ser recuperados pós-morte e criopreservados com sucesso. A proporção de espermatozóides viáveis e com acrossoma intacto não foi alterada nos espermatozóides criopreservados quando comparados aos coletados no epidídimo (HERRICK *et al.*, 2004).

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

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

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

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

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

AURICH *et al.* (2002), demonstraram não haver alteração na porcentagem de espermatozóides móveis e normais em diferentes raças de eqüinos, pois estes parâmetros não são afetados pelo tamanho do testículo e sim pela função do parênquima testicular.

2.3 AVALIAÇÃO DO SÊMEN

A avaliação do sêmen é classicamente realizada considerando-se os aspectos macroscópicos, microscópicos e físicos. Volume, coloração, viscosidade e

aspecto do sêmen são os parâmetros macroscópicos avaliados. Motilidade, vigor, concentração e morfologia são os parâmetros microscópicos avaliados (SILVA, 2000).

A motilidade diz respeito ao percentual de espermatozóides móveis numa amostra, enquanto o vigor refere-se à força de deslocamento, em uma escala de 0 a 5, onde 0 significa espermatozóides sem motilidade e 5, espermatozóides com deslocamento rápido e contínua progressão para adiante. Para determinação desses parâmetros o método mais usual, porém menos preciso, é o da avaliação subjetiva em microscopia óptica, com aumento de 100 a 400 vezes (SEAGER e PLATZ, 1977).

Apesar de a motilidade espermática ser o parâmetro mais utilizado na avaliação do sêmen, em algumas condições, pode ocorrer baixa capacidade fecundante com elevada motilidade espermática, devido a alterações principalmente no acrossoma (ENGLAND, 1993).

A concentração representa o número de espermatozóides por milímetro (mm^3) ou centímetro (cm^3) cúbico no ejaculado. O procedimento mais comum para se obter a concentração espermática consiste na contagem das células na câmara de Neubauer ou de Toma Nova, podendo ainda ser utilizada a espectrofotometria e o *Micro-cell-counter* (COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 1998).

A concentração espermática pode apresentar variação, tanto entre raças, como num mesmo animal, dependendo da freqüência de utilização desse macho para reprodução (SILVA, 2003).

Para avaliação das características morfológicas dos espermatozóides poderão ser utilizados esfregaços corados ou preparação úmida, em microscópio de contraste de fase. Como complemento é estimulado o uso de métodos de coloração específicas para determinadas partes do espermatozóide, como por exemplo, acrossoma (coloração pelo vermelho Congo), (CBRA, 1998).

BLOM (1977) descreve duas categorias morfológicas para os defeitos dos espermatozóides: primários, que ocorrem durante a espermatogênese, representando uma falha da espermatogênese; e secundários que ocorrem durante o trânsito pelos ductos, representando falhas na maturação. Os defeitos primários, portanto são defeitos testiculares e os secundários ocorrem na maturação, armazenamento, transporte ou até mesmo na manipulação do sêmen.

Na espécie eqüina, o total de defeitos entre primários e secundários, não deve ultrapassar 30% (COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 1998).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL

O experimento foi realizado no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná, localizado no Setor de Ciências Agrárias, Curitiba, Paraná.

3.2 ANIMAIS

Foram utilizados 19 epidídimos de 10 garanhões (figura 1), com idade entre 24 a 90 meses, de varias raças (tabela 1), oriundos de criatórios de Curitiba e Região Metropolitana. Os animais utilizados no experimento foram alojados no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná, em baias individuais, recebendo ração seca comercial¹ e volumoso três vezes ao dia e água *ad libitum*. Quando chegaram ao hospital veterinário receberam vacina contra tétano, leptospirose e raiva.

TABELA 1 – IDENTIFICAÇÃO DA RAÇA E IDADE DOS ANIMAIS UTILIZADOS NO EXPERIMENTO

Identificação/Garanhão	Raça	Idade (meses)
1	Lusitana	28
2	Pônei	40
3	Pônei	40
4	Crioula	60
5	Crioula	40
6	Puro Sangue Inglês	24
7	Puro Sangue Inglês	60
8	Quarto de Milha	48
9	Appaloosa	48
10	Appaloosa	90

¹ Níveis de garantia: proteína bruta - 13%; fibras totais - 10%; umidade - 13%; cálcio – 1,5%; fósforo – 0,5%.

FIGURA 1 - FOTOS DE ALGUNS ANIMAIS UTILIZADOS NO EXPERIMENTO



Os garanhões foram submetidos a exame andrológico prévio, sendo incluídos no experimento os animais que atenderam os requisitos mínimos descritos no Manual de Andrologia do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998) (Apêndice 1).

3.3 COLHEITA DE SÊMEN COM VAGINA ARTIFICIAL

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

3.4 AVALIAÇÃO DO SÊMEN RECÉM-COLHIDO

Após a colheita do sêmen, o ejaculado foi filtrado, o volume mensurado por visualização direta do sêmen em copo coletor graduado, e registrado o volume em mililitros (mL) e feita avaliação da motilidade e vigor. Em seguida o sêmen foi submetido ao processo de centrifugação (5.000 rotações por minuto, durante 10

minutos), sendo separado os espermatozóides do plasma seminal (sobrenadante), e a porção de sêmen recuperada, misturada a 10 ml de diluente Botu-Crio® pré-aquecido (37°C).

Logo após a diluição uma gota de sêmen misturada ao diluente foi colocada em uma lâmina e coberta por uma lamínula, ambas de vidro, pré-aquecidas a 37°C, para avaliação da motilidade dos espermatozóides, realizada em microscopia óptica², em aumento de 200 vezes, e registrada em dados percentuais. A determinação da intensidade do movimento dos espermatozóides (vigor) foi também realizada em microscopia óptica, em aumento de 200 vezes, atribuindo-se escala de 0 a 5, entre os valores mínimos e máximos observados, respectivamente.

Os parâmetros motilidade e vigor dos espermatozóides colhidos com a vagina artificial foram submetidos à avaliação imediata e uma hora depois de serem misturados ao diluente, para observar se o meio diluente alterava estes parâmetros.

A avaliação da concentração espermática (mm³) foi realizada em câmara de Toma Nova, utilizando-se sêmen diluído na proporção de 0,05 ml de sêmen para 10 ml de solução formol salina a 1% (1:100).

O número total de espermatozóides no ejaculado foi obtido multiplicando-se a concentração espermática (mm³) pelo volume de sêmen ejaculado.

Para avaliação das patologias espermáticas e integridade de acrossoma foi feito um esfregaço delgado com os espermatozóides diluídos e feito a coloração de CEROVSKY (1976), (Apêndice 2). A porcentagem de alterações espermáticas e a integridade de acrossoma foram obtidas pela contagem de 100 células espermáticas em microscópio de contraste de fase³ em objetiva de imersão.

As alterações espermáticas consideradas na avaliação foram: defeitos maiores, menores e totais, conforme o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998).

² Olympus – BH-2 – Japão.

³ Olympus-BX41TF - Japão

3.5 ORQUIECTOMIA EQUINA

Uma semana após a última colheita de sêmen utilizando-se a vagina artificial, os garanhões foram submetidos a orquiectomia bilateral. Sendo de temperamento dócil, os procedimentos cirúrgicos foram realizados com os animais em estação.

Decorridos 20 a 30 minutos da tranquilização com acepromazina 1% (0,05 mg/Kg/IV), os animais foram encaminhados à sala de preparação onde se efetuou a anti-sepsia com iodo-polivinil-pirrolidona do campo cirúrgico. Com 10 ml de lidocaína procedeu-se a infiltração no escroto, a um centímetro lateralmente a rafe mediana, completando-se a anestesia com aplicação intratesticular e no cordão espermático, logo acima do local demarcado para a emasculação.

Na seqüência após ter sido realizada a incisão de 7 a 10 centímetros (dependendo do tamanho do testículo) sobre o escroto, a um centímetro lateralmente a rafe mediana, prosseguiu-se com a abertura da túnica dartos e da fáscia escrotal. Por meio de compressão digital entre polegar e o indicador, o testículo emergiu e efetuou-se a incisão da túnica comum (ou vaginal parietal) ao longo do pólo caudal testicular e cordão espermático. Prosseguiu-se tracionando o testículo, o que facilitou o deslocamento entre este, o cordão vascular espermático, o ducto deferente, o músculo cremáster externo e a túnica comum.

Para finalizar a orquiectomia, efetuou-se a hemostasia do cordão espermático por compressão, durante cinco minutos, com o auxílio do emasculador de Chassaignac. O mesmo procedimento, durante 3 minutos, foi aplicado no músculo cremáster. Durante a preensão do cordão espermático com o emasculador, evitou-se a inclusão de tecidos circunjacentes, que poderiam prejudicar o estiramento e compressão dos vasos e, conseqüentemente, a hemostasia. Além disso, a rafe mediana foi ressecada para facilitar a drenagem e evitar a formação de seroma.

Para concluir a gonadectomia, repetiu-se o procedimento no testículo contralateral.

Durante o período pós-operatório, diariamente a ferida cirúrgica foi tratada com iodo-polivinil-pirrolidona, durante 7 dias. Além disso, foi administrado 7 milhões

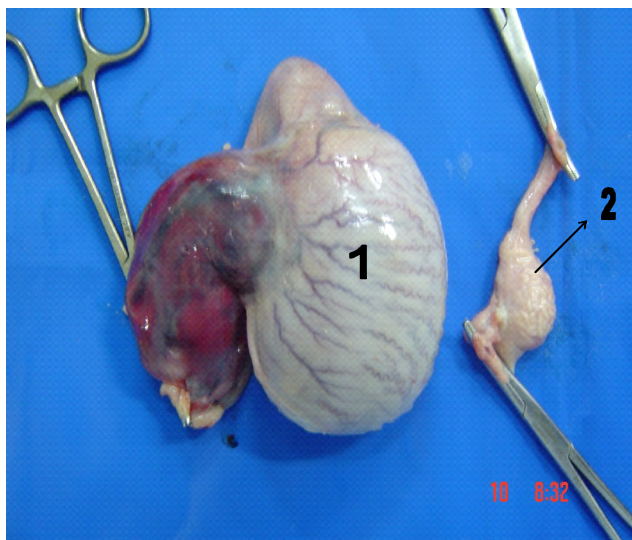
de unidades internacionais de benzipenicilina procaína mais diidroestreptomicina a cada 24 horas durante 5 dias.

3.6 TÉCNICA DE COLHEITA DOS ESPERMATOZÓIDES DA CAUDA DO EPIDÍDIMO

Neste experimento, imediatamente após a orquiectomia, os testículos ficaram armazenados separadamente em sacos plásticos abertos, a temperatura ambiente (18-25°C), até o momento da manipulação, sendo os quatro testículos dos dois primeiros garanhões armazenados por seis horas para depois serem manipulados, os quatro testículos seguintes ficaram armazenados por 12 horas para depois serem manipulados. O tempo para a colheita e avaliação dos espermatozóides de cada grupo foi aumentado gradativamente de 6 em 6 horas, até 30 horas pós-orquiectomia.

Para a colheita dos espermatozóides da cauda do epidídimo, o complexo testículo-epidídimo foi separado em duas partes: testículo e cauda do epidídimo (figura 2), sendo feita uma lavagem da cauda do epidídimo com soro fisiológico pré-aquecido (37°C), para remoção do sangue.

FIGURA 2 - COMPLEXO TESTÍCULO-CAUDA DO EPIDÍDIMO DO GARANHÃO SEPARADOS

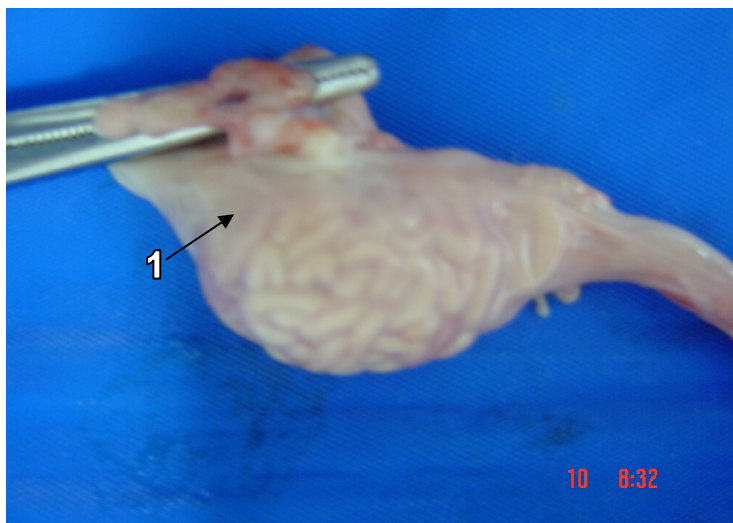


1- Testículo; 2 – Cauda do epidídimo

A técnica de colheita de espermatozoides da cauda de epidídimo pelo método de GARDE *et al.* (1994), consiste em injetar diluente no ducto deferente e recuperá-lo através de um corte na junção do corpo com a cauda do epidídimo, esta técnica foi modificada neste experimento, sendo a colheita dos espermatozoides da cauda do epidídimo realizada da seguinte maneira:

O tecido conjuntivo que recobre a cauda do epidídimo (figura 3) foi removido com uma tesoura cirúrgica e pinças hemostáticas, sendo dissecado cuidadosamente para evitar o rompimento dos vasos sanguíneos e do ducto epididimário.

FIGURA 3 - TECIDO CONECTIVO QUE RECOBRE A CAUDA DO EPIDÍDIMO DO GARANHÃO



1- Tecido conectivo

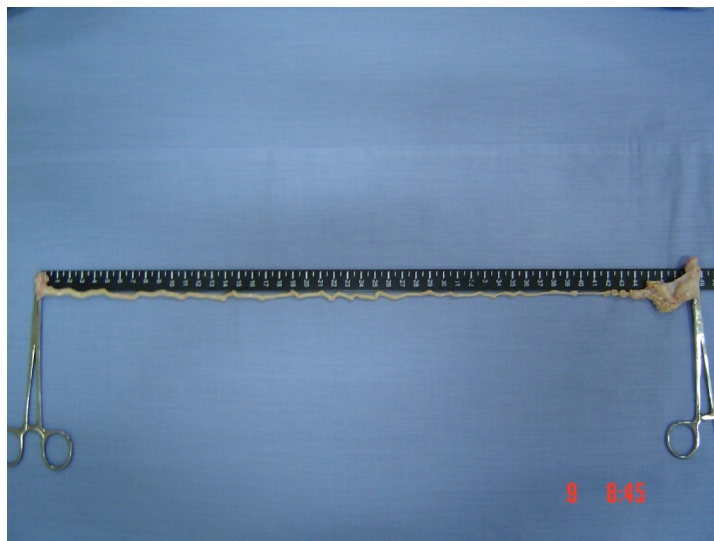
Após a remoção dos tecidos que envolvem o epidídimo, foram desfeitos os contornos do ducto epididimário, que formam a cauda do mesmo conforme demonstra a figura 4.

FIGURA 4 - DISSECAÇÃO DA CAUDA DO EPIDÍDIMO DO GARANHÃO



Em seguida o ducto epididimário foi segmentado em três partes para facilitar a lavagem e colheita dos espermatozóides, tendo cada segmento de 20 a 40 centímetros (figura 5), dependendo do tamanho da cauda do epidídimo.

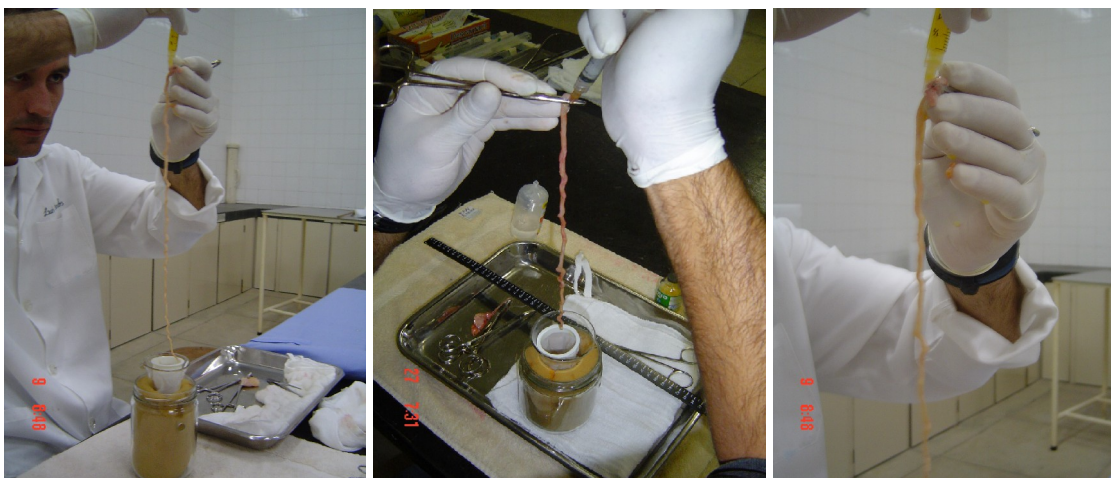
FIGURA 5 - TAMANHO DE UM SEGMENTO DISSECADO DA CAUDA DO EPIDÍDIMO DO GARANHÃO



*Segmento com 40 centímetros

Para realização da lavagem uma das extremidades do segmento foi pinçada, para evitar o extravasamento dos espermatozóides, mantendo o segmento estendido na posição vertical, sobre um filtro acoplado a um copo coletor pré-aquecido (37°C), sendo o diluente injetado no lúmen do mesmo, com auxílio de uma seringa e agulha (0,45 X 13), imediatamente abaixo do local pinçado, fazendo com que os espermatozóides fossem carreados pelo diluente e recuperados na outra extremidade, como demonstra a figura 6.

FIGURA 6 - LAVAGEM DE UM SEGMENTO DA CAUDA DO EPIDÍDIMO DE GARANHÃO



Após a lavagem do último segmento, os espermatozóides dos três segmentos (misturados) foram submetidos aos mesmos parâmetros de avaliação do sêmen obtido com a vagina artificial.

A lavagem foi feita com o mesmo diluente utilizado no sêmen colhido com a vagina artificial (Botu-Crio®, pré-aquecido a 37°C). Para lavagem de cada cauda do epidídimo do garanhão foram utilizados 10 mL de diluente, divididos entre os três segmentos.

A motilidade e o vigor foram avaliados imediatamente e uma hora depois da colheita dos espermatozóides.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados de motilidade, vigor, número total de espermatozóides, espermatozóides morfológicamente deformados e defeitos de acrossoma foram submetidos à análise de variância inteiramente casualizado com 6 tratamentos e 4 repetições, com aplicação do teste de Tukey para comparação de médias.

Os parâmetros avaliados dos espermatozóides, uma hora após a diluição, colhidos com a vagina artificial foram utilizados como grupo controle (0 hora) para

avaliação comparativa da diminuição da viabilidade dos espermatozoides epididimais em função do tempo pós-orquiectomia.

4. RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA DO SÊMEN COLHIDO COM VAGINA ARTIFICIAL

Na tabela 2 são apresentados os resultados das características seminais dos animais incluídos no experimento.

Pode-se observar na tabela 2 que as características seminais descritas para motilidade e o vigor dos garanhões utilizados neste experimento, colhidos com vagina artificial, estavam condizentes com os parâmetros considerados normais para a espécie eqüina (Apêndice 1), sendo a variação da motilidade de 70 para 80% entre os garanhões, bem como, a variação de 1 ponto para o vigor, na escala de 0 a 5.

Observa-se na tabela 2, que houve variação no número total de espermatozóides colhidos, sendo que os garanhões 1 e 6 apresentaram número total de espermatozóides inferior por estarem no grupo de animais com idade inferior a 30 meses, os garanhões 2 e 3 por serem pôneis e o garanhão 5 por ser criptorquida.

Quanto ao percentual de espermatozóides morfologicamente deformados (EMD), houve uma variação de 16 a 42% (as deformações mais comuns foram encontradas na cabeça e peça intermediária) entre os garanhões. Quanto às alterações de acrossoma, podemos observar que os garanhões apresentaram deformações de 3 a 6%.

A motilidade e o vigor dos espermatozóides colhidos com a vagina artificial não apresentaram variação nas avaliações realizadas no momento da diluição e uma hora depois.

TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS DO SÊMEN COLHIDO COM VAGINA ARTIFICIAL DOS GARANHÕES

Garanhões	Características Seminais				
	Motilidade %	Vigor (0-5)	Número Total de Espermatozoides (bilhões)	* EMD %	Defeitos de Acrossoma %
01	75%	4	7,3	20	3
02	80%	4	5,1	22	3
03	75%	4	5,4	16	4
04	80%	5	31,9	19	4
05	75%	4	4,9	20	4
06	70%	4	1,95	42	6
07	80%	5	13,5	23	3
08	80%	5	14,5	21	4
09	80%	4	28	18	4
10	80%	5	35,2	18	5

*EMD: espermatozoides morfológicamente deformados

*Características seminais dos garanhões, referentes à colheita com vagina artificial sete dias antes da orquiectomia

4.2 AVALIAÇÃO COMPARATIVA DO SÊMEN COLHIDO COM VAGINA ARTIFICIAL E DOS ESPERMATOZÓIDES COLHIDOS DA CAUDA DO EPIDÍDIMO DOS GARANHÕES

A colheita dos espermatozoides da cauda do epidídimo dos garanhões pela modificação da técnica de GARDE *et al.* (1994), foi realizada de maneira rápida, sem dificuldades e com ausência de outros tipos celulares com os espermatozoides.

4.2.1 Motilidade e Vigor

Quanto à avaliação comparativa da motilidade e do vigor dos espermatozoides colhidos da cauda dos epidídimos (armazenados a temperatura ambiente nos grupos 6, 12, 18, 24 e 30 horas pós-orquiectomia), pode-se observar na tabela 3, que as avaliações realizadas 6 e 12 horas pós-orquiectomia não apresentaram diferença significativa ($p > 0,005$) em relação aos espermatozoides colhidos com a vagina artificial. Quanto às avaliações realizadas 18, 24 e 30 horas

pós-orquiectomia, observou-se diminuição significativa ($p < 0,005$) da motilidade e do vigor entre os grupos e relativo à vagina artificial.

TABELA 3 - AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA MOTILIDADE E VIGOR DOS ESPERMATOZÓIDES COLHIDOS COM VAGINA ARTIFICIAL E DA CAUDA DO EPIDÍDIMO DOS GARANHÕES EM FUNÇÃO DO TEMPO

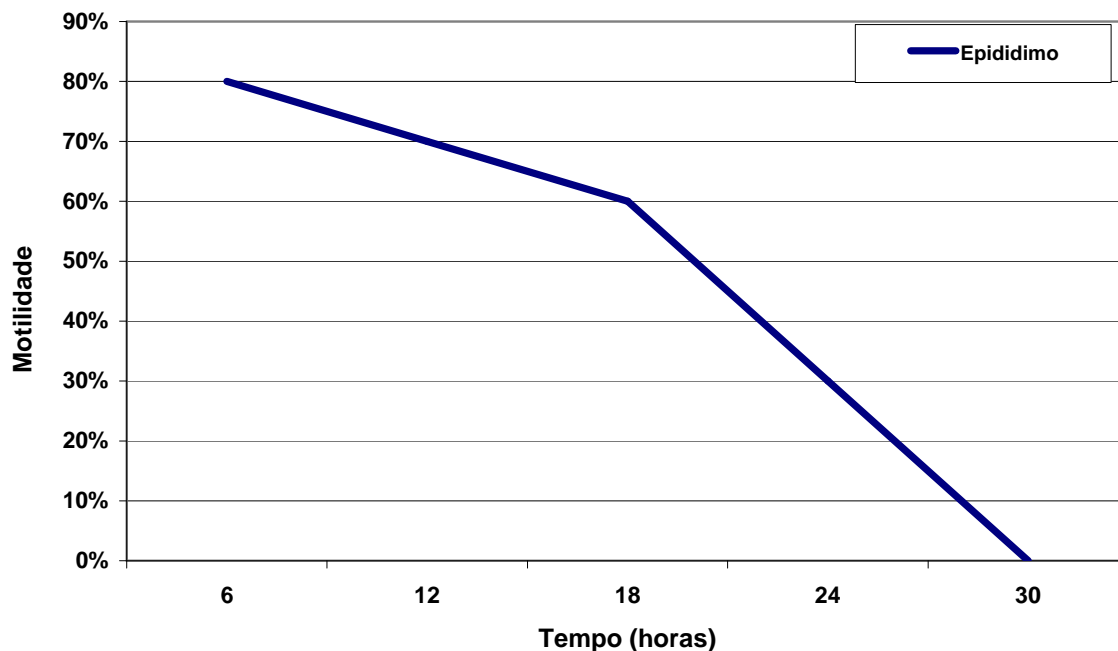
	n	Motilidade			Vigor		
		Média* X	Desvio Padrão	C.V.**	Média* X	Desvio Padrão	C.V.**
Vagina Artificial	--	80% a	0	0%	4 a	0	0%
Epidídimos 6 horas	4	80% a	0	0%	4 a	0	0%
Epidídimos 12 horas	4	70% a	0,08	11,6%	4 a	0	0%
Epidídimos 18 horas	4	60% b	0,08	11,6%	3 b	0	0%
Epidídimos 24 horas	4	30% c	0,04	13,6%	2 c	0	0%
Epidídimos 30 horas	3	0% d	0	0%	0 d	0	0%

* As médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

**C.V.= Coeficiente de Variação

A figura 7 demonstra o declínio da motilidade dos espermatozóides colhidos da cauda do epidídimo em diferentes horários pós-orquiectomia. Pode-se observar que até 18 horas pós-orquiectomia a motilidade decrescia em uma proporção menos intensa a cada 6 horas, e a partir das 18 horas o decréscimo da motilidade foi mais intenso entre os grupos.

FIGURA 7 - AVALIAÇÃO DO DECRÉSCIMO DA MOTILIDADE (%) DOS ESPERMATOZÓIDES COLHIDOS DA CAUDA DO EPIDÍDIMO DOS GARANHÕES EM FUNÇÃO DO TEMPO PÓS-ORQUIECTMIA



A tabela 4 apresenta os resultados comparativos da motilidade e vigor dos espermatozoides avaliados no momento da colheita da cauda do epidídimo e avaliados uma hora após repousarem no diluente.

Observou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) da motilidade uma hora após a adição de diluente nos grupos de 6, 12, 18, 24 horas pós-orquiectomia, o grupo 30 horas não apresentou diferença entre a motilidade no momento da colheita e uma hora depois. Com relação ao vigor os grupos 6, 12, 18, 24 horas pós-orquiectomia apresentaram melhora significativa do vigor. O grupo 30 horas não apresentou alteração.

TABELA 4 - AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA MOTILIDADE E VIGOR DOS ESPERMATOZÓIDES DOS GARANHÕES NO MOMENTO DA COLHEITA DA CAUDA DO EPIDÍDIMO (0 HORA) E UMA HORA APÓS A COLHEITA (1 HORA)

Tempo (horas)	Epidídimos (n)	Médias	
		Motilidade (%) / Vigor 0 hora	Motilidade (%) / Vigor 1 hora
6	4	70 / 4 a	80 / 4 b
12	4	65 / 3 a	70 / 4 b
18	4	50 / 2 a	60 / 3 b
24	4	20 / 1 a	30 / 2 b
30	3	0 a	0 a

* As médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

As figuras 8 e 9 apresentam as diferenças da motilidade e vigor respectivamente, no momento da colheita dos espermatozóides da cauda do epidídimo e uma hora depois.

FIGURA 8 - AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA MOTILIDADE (%) NO MOMENTO DA COLHEITA DOS ESPERMATOZÓIDES DA CAUDA DO EPIDÍDIMO DOS GARANHÕES (INICIAL) E UMA HORA APÓS (1 HORA)

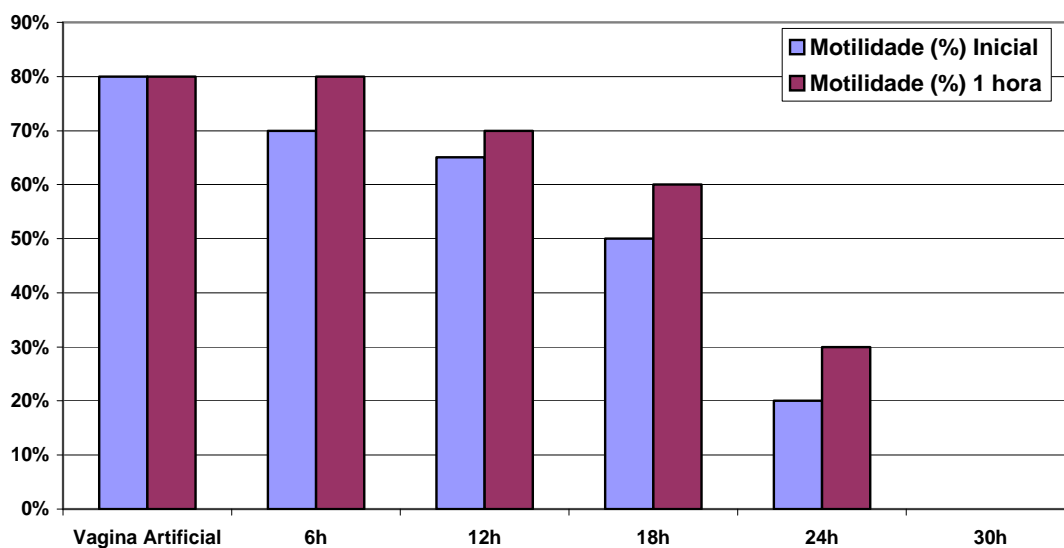
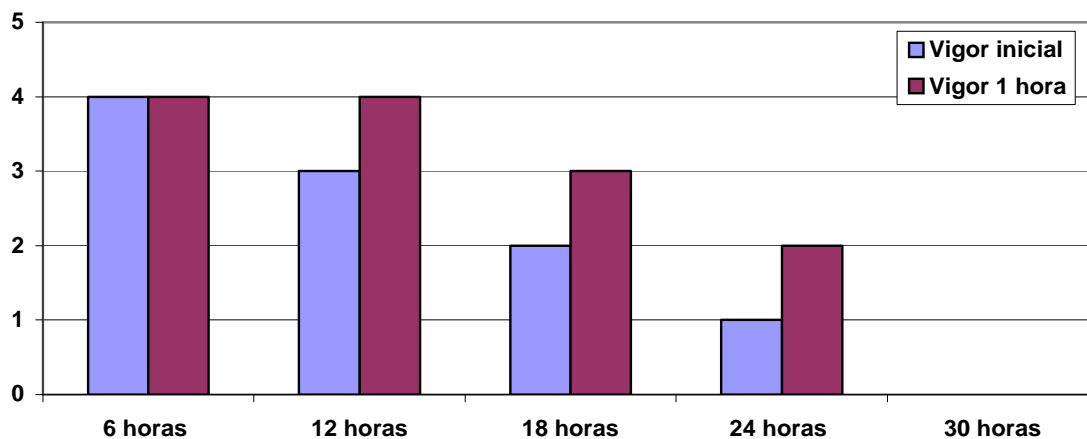


FIGURA 9 - AVALIAÇÃO COMPARATIVA DO VIGOR NO MOMENTO DA COLHEITA DOS ESPERMATOZÓIDES DA CAUDA DO EPIDÍDIMO DOS GARANHÕES (INICIAL) E UMA HORA APÓS (1 HORA)



4.2.2 Número Total de Espermatozóides

O número total de espermatozóides colhidos da cauda do epidídimo não está relacionado com o tempo pós-orquiectomia mas são apresentados de forma individual para cada garanhão na tabela 5.

Na tabela 5 pode-se observar que o número total de espermatozóides colhidos da cauda de ambos os epidídimos de um mesmo garanhão ou apenas de um dos epidídimos é significativamente ($p < 0,05$) superior ao número total de espermatozóides colhidos com a vagina artificial, com exceção dos garanhões 1 e 6 pela pouca idade (menos de 30 meses).

TABELA 5 - COMPARAÇÃO DO NÚMERO TOTAL DE ESPERMATOZÓIDES (BILHÕES) COLHIDOS COM A VAGINA ARTIFICIAL E DA CAUDA DO EPIDÍDIMO DOS GARANHÕES

Garanhões	Número Total de Espermatozóides (bilhões)			
	Vagina Artificial	Epidídimo Esquerdo	Epidídimo Direito	Epidídimo Esquerdo + Epidídimo Direito
1	7,3	7,6	5,3	12,9
2	5,1	17,1	11,7	28,8
3	5,4	17,6	9,2	26,8
4	31,9	55,5	57,6	113,1
5	4,9	21,8	*	21,8
6	1,95	5,8	0,7	6,5
7	13,5	28	24	52
8	14,5	19	16	35
9	28	35,7	21,6	57,3
10	35,2	57,3	40,8	98,1

*O garanhão 5 era criptorquida

A tabela 6 apresenta a média do número total de espermatozóides de todos os garanhões colhidos com vagina artificial, epidídimos esquerdos, direitos e de ambos os epidídimos.

Verifica-se que a média do número total de espermatozóides colhidos tanto na cauda do epidídimo esquerdo quanto direito foi significativamente ($p < 0,05$) maior do que os colhidos com vagina artificial, e que o epidídimo esquerdo apresentou número total de espermatozóides colhidos significativamente superior ($p < 0,05$) ao epidídimo direito.

TABELA 6 - COMPARAÇÃO DA MÉDIA DO NÚMERO TOTAL DE ESPERMATOZÓIDES (BILHÕES) COLHIDOS COM A VAGINA ARTIFICIAL E DA CAUDA DO EPIDÍDIMO DOS GARANHÕES

Garanhões (n)	Média* (X) do Número Total de Espermatozóides (bilhões)			
	Vagina Artificial	Epidídimo Esquerdo	Epidídimo Direito	Epidídimo Esquerdo + Direito
10	14,7 a	26,5 b	20,7 c	47,2 d

* As médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

A figura 10 representa a comparação média do número total de espermatozóides colhidos com vagina artificial, dos epidídimos esquerdos, direitos e de todos os epidídimos.

A figura 11 representa a comparação média do número total de espermatozóides colhidos dos epidídimos esquerdos e direitos dos garanhões.

FIGURA 10 - COMPARAÇÃO DO NÚMERO TOTAL DE ESPERMATOZÓIDES (BILHÕES) COLHIDOS COM A VAGINA ARTIFICIAL E DA CAUDA DO EPIDÍDIMO DOS GARANHÕES

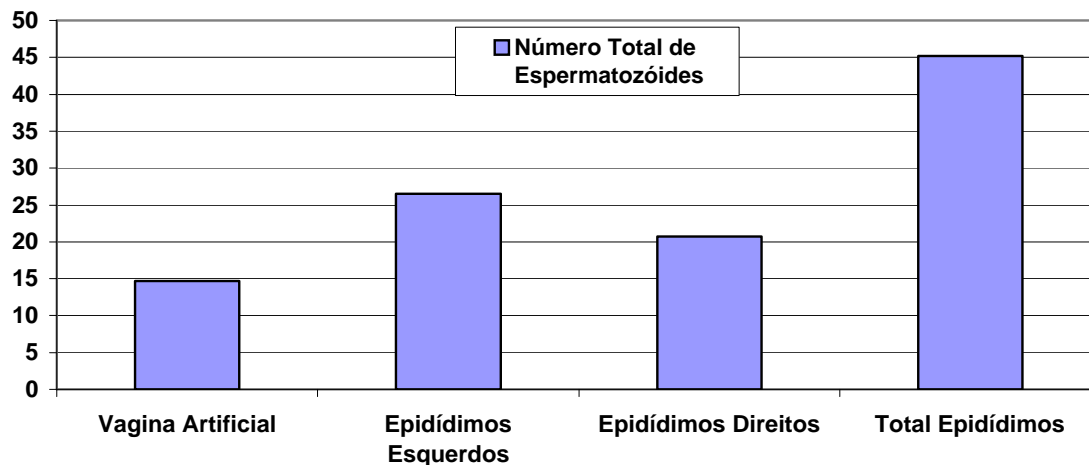
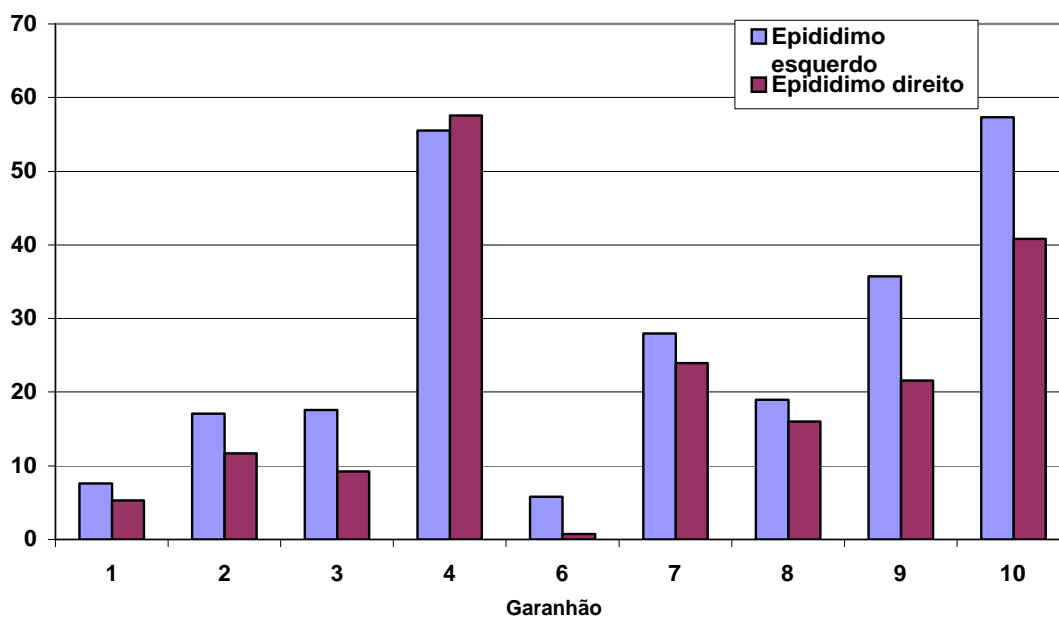


FIGURA 11 - COMPARAÇÃO DO NÚMERO TOTAL DE ESPERMATOZÓIDES (BILHÕES) COLHIDOS DA CAUDA DO EPIDÍDIMO ESQUERDO E DIREITO DOS GARANHÕES



4.2.3 Espermatozóides Morfologicamente Deformados e Defeitos de Acrossoma

Na tabela 7 podemos observar que não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre o número de espermatozóides morfologicamente deformados colhidos com vagina artificial e os grupos 6 e 18 horas pós-orquiectomia, já os grupos 12, 24 e 30 horas apresentaram aumento significativo ($p<0,05$) das deformações em relação à vagina artificial.

Nos grupos colhidos com vagina artificial e da cauda do epidídimo 6 e 18 horas pós-orquiectomia o percentual de alterações na cabeça dos espermatozóides (sendo a cabeça estreita a deformação mais comum) foi de 10%, 10% e 11% respectivamente, e 12% de deformações na peça intermediária e principal (a clave de sol foi a deformação mais comum) nos três grupos; já nos grupos 12 e 24 horas pós-orquiectomia o percentual de alterações da cabeça dos espermatozóides foi de 13% e 11% respectivamente (cabeça estreita e deformada a alteração mais comum); na peça intermediária, principal e terminal o percentual foi de 11% e 13% respectivamente (clave de sol e gota citoplasmática foram os defeitos mais comuns); o grupo 30 horas apresentou 12% de alterações na cabeça dos espermatozóides (deformação da cabeça foi a alteração mais comum); 15% de defeitos na peça intermediária, principal e terminal (clave de sol enrolada as alterações mais comuns).

Ainda na tabela 7 podemos observar que os defeitos de acrossoma não apresentaram diferença significativa ($p>0,05$) entre os grupos analisados 6, 12 e 18 horas pós-orquiectomia em relação à vagina artificial, apresentando aumento significativo ($p<0,05$) somente os grupos 24 e 30 horas (ausência e edema de acrossoma foram as alterações mais comuns).

TABELA 7 - AVALIAÇÃO COMPARATIVA DO PORCENTUAL DE ESPERMATOZÓIDES MORFOLOGICAMENTE DEFORMADOS (EMD) E DE DEFEITOS DE ACROSSOMA (DA)

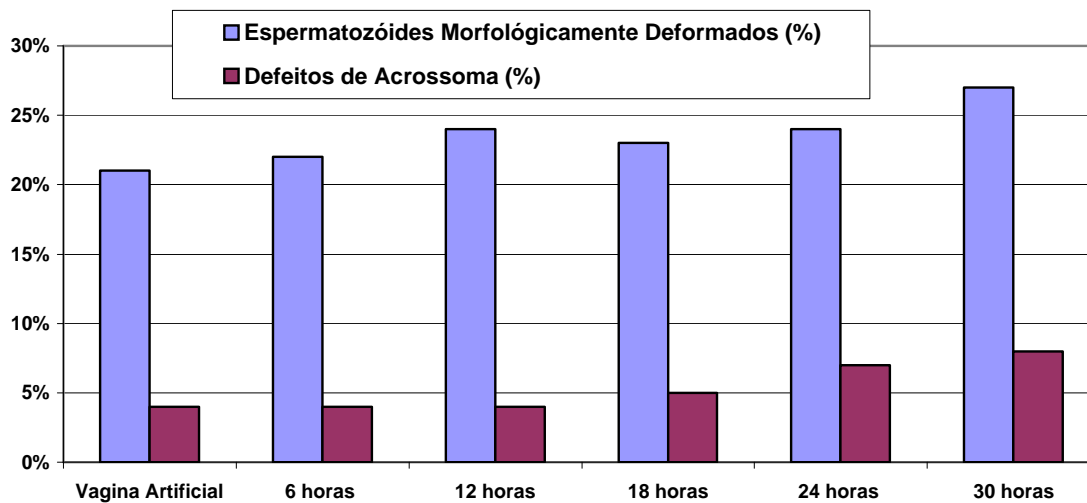
Origem dos Espermatozóides	EMD (%)			DA (%)		
	Média* X	Desvio Padrão	C. V.**	Média* X	Desvio Padrão	C. V.**
Vagina Artificial	21a	0	0%	3 a	0	0%
Epidídimo 6 horas (n=4)	22 a	0,81	3,7%	3 a	0,81	20,4%
Epidídimo 12 horas (n=4)	24 b	1,63	6,8%	4 a	0,81	20,4%
Epidídimo 18 horas (n=4)	23 a	1,63	6,8%	5 a	0,81	20,4%
Epidídimo 24 horas (n=4)	24 b	0,81	3,4%	7 b	0,81	11,6%
Epidídimo 30 horas (n=3)	27 c	0,81	3,0%	8 b	0	0%

As médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

**C.V.= Coeficiente de Variação

A figura 12 representa a porcentagem de espermatozóides morfológicamente deformados e os defeitos de acrossoma em função do tempo pós-orquiectomia.

FIGURA 12 - AVALIAÇÃO COMPARATIVA DO PORCENTUAL DE ESPERMATOZÓIDES MORFOLOGICAMENTE DEFORMADOS (EMD) E DE DEFEITOS DE ACROSSOMA (DA) EM FUNÇÃO DO TEMPO PÓS-ORQUIECTOMIA DOS GARANHÕES



5. DISCUSSÃO

Todos os animais utilizados neste experimento apresentaram fertilidade normal para a espécie eqüina quanto aos valores seminais obtidos com a vagina artificial estando de acordo com os padrões do Colégio Brasileiro de Reprodução (1998) e com os valores encontrados por LIMONE *et al.* (2002) e MORRIS *et al.* (2002).

Muitos trabalhos relatam os efeitos do tempo pós-morte sobre os espermatozóides epididimais armazenados a temperatura de 5°C, mas nenhum é descrito com epidídimos de garanhão armazenados a temperatura ambiente, não existindo, na espécie eqüina, parâmetros para comparação com o presente experimento.

5.1 COLHEITA DOS ESPERMATOZÓIDES EPIDIDIMAIS

Os espermatozóides epididimais foram colhidos sem dificuldades, através da modificação da técnica de Garde *et al.* (1994), sendo a lavagem com diluente dos túbulos epididimais segmentados em três partes uma técnica eficiente, pois as amostras obtidas foram de boa qualidade, sem células contaminantes, com número total de espermatozóides significativamente superior aos colhidos com a vagina artificial, sendo a colheita dos espermatozóides da cauda do epidídimo dos garanhões realizada de modo rápido e fácil, devido ao calibre dos ductos epididimais, sem que as alterações teciduais que ocorrem em função do tempo pós-orquiectomia dificultassem a colheita.

A injeção de diluente (LAMBRECHTS *et al.*, 1999) para promover o fluxo espermático para o exterior do ducto é mais eficiente do que a injeção de ar (KIKUCHI *et al.*, 1998), além dos espermatozóides serem carregados com maior facilidade e segurança, por saírem diluídos dos túbulos.

MARTINEZ-PASTOR *et al.* (2006), comparam os métodos de colheita de espermatozóides da cauda do epidídimo através da lavagem com diluente e método da flutuação em meio diluente, obtendo concentração de 6,4 e 4,9 bilhões de espermatozóides respectivamente e, em 79% das amostras, obtidas por lavagem

estavam livres de outros tipos de células, contra 100% de amostras contaminadas com outras células pelo método de flutuação. Durante a avaliação das amostras de espermatozóides obtidos pelo método de lavagem neste experimento, não foram observadas outras células contaminantes.

5.2 MOTILIDADE E VIGOR

A motilidade e o vigor inicial dos espermatozóides colhidos com vagina artificial foram maiores do que a dos espermatozóides colhidos da cauda do epidídimo, diferença essa que pode ser atribuída a vários fatores. Os espermatozóides adquirem movimento e completam quase totalmente o processo de maturação na cauda do epidídimo. Nesses processos os espermatozóides sofrem modificações químicas e estruturais responsáveis tanto pela maturação como pelo início do movimento das células espermáticas. Como o processo de formação e liberação dos espermatozóides ocorre de forma cíclica, provavelmente nas colheitas foram obtidas populações de espermatozóides em vários estágios de maturação (BARTH e OKO, 1989), fato que poderia explicar a menor motilidade e vigor dos espermatozóides epididimais. Os espermatozóides colhidos com a vagina artificial foram diluídos inicialmente em plasma seminal que é o meio diluente ideal para eles, e após a centrifugação foram separados do mesmo e misturados ao diluente, já os da cauda do epidídimo foram diluídos somente em diluente artificial que simulavam o plasma seminal.

A melhora da motilidade e vigor dos espermatozóides epididimais após uma hora no diluente é atribuída ao fato de quando os espermatozóides são recuperados, eles estão concentrados e na ausência do plasma seminal que, além da função de transporte, sustenta e melhora a motilidade inicial após a ejaculação, aumentando a longevidade dos espermatozóides segundo TIPLADY *et al.* (2002). KATILA *et al.* (2002), demonstraram que espermatozóides colhidos da cauda do epidídimo tinham sua motilidade total, progressiva e vigor melhorados 15 minutos após a adição de plasma seminal, papel este realizado pelo diluente Botu-Crio® em nosso experimento, fornecendo um meio nutritivo ativando os espermatozóides para fertilização.

Os valores da motilidade e vigor dos espermatozoides epididimais até 18 horas pós-orquiectomia foram semelhantes aos da vagina artificial e aos trabalhos de BRUEMMER *et al.* (2002); JAMES *et al.* (2002); KATILA *et al.* (2002) e TIPLADY *et al.* (2002), trabalhando com espermatozoides recuperados de epidídimos armazenados a 4°C de garanhões.

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

Todos os epidídimos após 18 horas forneceram espermatozoides com qualidade muito inferior à obtida com a vagina artificial. SONGSASEN *et al.* (1998), trabalhando com ratos demonstraram que as degenerações dos túbulos epididimais começam afetar os espermatozoides epididimais próximo das 18 horas pós-morte, tempo condizente com os valores encontrados neste experimento, pois a partir das 18 horas ocorreu diminuição acentuada da qualidade dos espermatozoides epididimais.

O limite de 18 horas para a colheita de espermatozoides de epidídimos armazenados a temperatura ambiente com motilidade e vigor semelhantes ao da vagina artificial é muito inferior ao encontrado por JAMES *et al.* (2002) em garanhões, GARDE *et al.* (1998) em cervídeos, SANKAI *et al.* (2001) em ratos e YU e LEIBO (2002) em cães, que recuperaram espermatozoides epididimais viáveis por até 96 horas pós-morte. Estes valores são muito superiores aos encontrados em nosso experimento, porque eles mantiveram os epidídimos refrigerados a 5°C após a morte do animal. A temperatura mais baixa retarda o processo de degeneração e diminui o metabolismo dos espermatozoides, mantendo-os vivos por mais tempo.

MARTINEZ-PASTOR *et al.* (2005 a), relataram que não existe diferença na motilidade dos espermatozoides ejaculados e de epidídimos armazenados a 5°C de cervídeos por até 48 horas.

CHRISTIAN *et al.* (1993) e KISHIKAWA *et al.* (1999) em ratos, GARDE *et al.* (1994) em caprinos, KAABI *et al.* (2003) em ovinos, demonstraram que espermatozoides epididimais viáveis podem ser recuperados de epidídimos

armazenados a temperatura ambiente por até 24 horas, valores estes, próximos aos encontrados em nosso experimento.

5.3 NÚMERO TOTAL DE ESPERMATOZÓIDES RECUPERADOS

O número total de espermatozóides colhidos da cauda do epidídimo, através da técnica de fluxo retrógrado modificada, foi muito superior aos encontrados no sêmen colhido com a vagina artificial, justificando que a cauda do epidídimo possui a função de armazenamento, sendo liberados em cada ejaculação uma parcela dos espermatozóides epididimais (SULLIVAN *et al.*, 2005; JOHNSON *et al.*, 2000). Os espermatozóides obtidos da cauda do epidídimo não estavam diluídos com as secreções liberadas durante a ejaculação, fato este, que explica a alta concentração de espermatozóides.

A avaliação do número total de espermatozóides colhidos da cauda do epidídimo corrobora com os valores relatados por BEDFORD (1994), observando que dependendo do tamanho da cauda do epidídimo, idade e atividade sexual, um ganhão pode armazenar na cauda do epidídimo espermatozóides suficientes para até dez ejaculados consecutivos, justificando os ganhões 2 e 3 terem um menor número de espermatozóides, pelo seu tamanho (pôneis) e aos ganhões 1 e 6 pela sua pouca idade (28 e 24 meses respectivamente). Os ganhões que obtiveram maior diferença entre o número total de espermatozóides colhidos da cauda do epidídimo e com a vagina artificial, tinham os testículos maiores por serem mais velhos (mais de 40 meses) ou com histórico de atividade sexual anterior ao experimento.

O fato de 9 dos 10 ganhões utilizados no experimento apresentarem maior número total de espermatozóides recuperados do testículo esquerdo em relação ao direito não é relatado em nenhum trabalho. Este fato pode ser resultado da pouca idade dos ganhões e inatividade sexual (CARD, 2005), já que o único ganhão que apresentou mais espermatozóides no testículo direito tinha atividade reprodutiva anterior ao experimento.

5.4 ESPERMATOZÓIDES MORFOLÓGICAMENTE DEFORMADOS E DEFEITOS DE ACROSSOMA

Não houve relação entre o tempo pós-orquiectomia e a porcentagem de espermatozóides morfológicamente deformados até 18 horas, fato também relatado por PASTOR-MARTINEZ *et al.* (2005b) em ruminantes, KATO *et al.* (2002) em ratos; MARTINS *et al.* (2003) em cães; SOLER *et al.* (2003) em cervídeos; TIPLADY *et al.* (2002) e JAMES *et al.* (2002) em garanhões, sendo todos os espermatozóides recuperados de epidídimos resfriados a 5°C.

A média elevada de espermatozóides morfológicamente deformados no grupo 12 horas pós-orquiectomia ocorreu devido ao epidídimo direito do garanhão 6, que havia sofrido processo de deiscência testicular recente, mantendo a porcentagem de espermatozóides morfológicamente deformados elevada até o desenvolvimento completo da gônada (CARD, 2005).

O aumento dos espermatozóides morfológicamente deformados 18 horas pós-orquiectomia está relacionado com a decomposição tecidual, diminuição do pH e exaustão metabólica dos espermatozóides, aumentando as deformações de origem secundária, estando de acordo com os resultados obtidos por BRIZ *et al.* (1996).

Com relação aos defeitos de acrossoma houve um aumento da porcentagem de defeitos em função do tempo após 18 horas. Como o acrossoma possui uma membrana sensível e é repleto de enzimas e o tempo pós-morte pode alterar esta composição, aumentando os defeitos de acrossoma CARD (2005).

KATILA *et al.* (2002) em garanhões; MARTINEZ-PASTOR *et al.* (2006) em cervídeos e KIKUCHI *et al.* (1998) em ratos obtiveram diferenças na porcentagem de acrossomas normais do ejaculado e epidídimo, fato que é explicado pelo processo de criopreservação ao qual foram submetidos os espermatozóides. KAABI *et al.* (2003) relatam que a integridade do acrossoma é mais afetada nos espermatozóides armazenados a temperatura ambiente do que nos armazenados a 5°C.

A frequência das alterações espermáticas do ejaculado e dos espermatozóides da cauda do epidídimo aumenta quando os animais são submetidos a uma alta frequência de coleta de sêmen, devido ao pouco tempo que os espermatozóides permanecem no ducto epididimário, necessário para sua

maturação. Esta alta frequência também altera a absorção/secreção dos fluídos epididimais, alterando o balanço das proteínas e íons que interferem no processo de maturação (PRUNEDA *et al.*, 2005). Os defeitos acima da média do garanhão 6 não foram decorrentes de exaustão espermática e sim pela imaturidade sexual conforme relata CARD (2005).

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos neste experimento para avaliação comparativa da viabilidade dos espermatozóides colhidos da cauda do epidídimo em função do tempo pós-orquiectomia em relação aos colhidos com a vagina artificial concluiu-se que:

- A colheita de espermatozóides da cauda do epidídimo através da modificação da técnica de GARDE *et al*, (1994), pôde ser realizada de maneira rápida e eficiente.
- Espermatozóides viáveis foram colhidos da cauda de epidídimos armazenados a temperatura ambiente, de garanhões, por até 24 horas pós-orquiectomia.
- A motilidade e o vigor foram os parâmetros que tiveram maior influência do tempo pós-orquiectomia,
- O número total de espermatozóides colhidos da cauda de apenas um dos epidídimos do mesmo garanhão foi significativamente superior ao número total de espermatozóides colhido com vagina artificial em 94% dos epidídimos.

APÊNDICES

Apêndice 1 - Características seminais desejáveis para efeito de seleção de garanhões segundo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998).

Variável	Valores Médios
Motilidade espermática	70%
Vigor	3
Nº total de espermatozoides	200 milhões / dose inseminante
Espermatozoides normais	70%

Apêndice 2 - Coloração pelo Vermelho Congo (CEROVSKY, 1976).

1 – preparar 100 ml de solução aquosa saturada de vermelho congo;

2 - preparar 100 ml de solução aquosa a 0.5% de violeta de genciana;

- fazer esfregaço delgado com sêmen fresco e secar ao ar;
- imergir a lâmina na solução de vermelho congo por um minuto;
- lavar em água corrente suavemente e secar ao ar;
- imergir na solução de violeta de genciana por 30 segundos;
- lavar em água corrente suavemente e secar ao ar;

REFERÊNCIAS

- AMANN, R.P. Physiology and endocrinology. **Equine Reproduction**, p.658-673, 1993.
- ASHER, G.W.; BERG, D.K.; EVANS, G. Storage of semen and artificial insemination in deer. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.195-211, 2000.
- AURICH, J.E.; ACHMANN, R.; AURICH, C. Semen parameters and level of heterozygosity in Austrian draught horse stallions. **Theriogenology**, v.58, p.393-396, 2002.
- BARTELS, P.; LUBBE, K.; KILIAN, I.; FRIEDMANN, Y. DYK, G.; MORTIMER, D. In vitro maturation and fertilization of lion (*Panthera leo*) oocytes using frozen-thawed epididymal spermatozoa recovered by cauda epididymectomy of an immobilized lion. **Theriogenology**, v.53, p.325, 2000.
- BARTH, A.D.; OKO, R.J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames: Iowa State University Press, p.285, 1989.
- BEDFORD, J.M. The status and the state of the human epididymis. **Human Reproduction**, v.9, p.2187-2199, 1994.
- BLOM, E. Sperm morphology with reference to bull infertility. In: **First All India Symposium Animal Reproduction**, p.61-81, 1977.
- BRANDT, H.; ACOTT, T.S.; JOHNSON, D.B. Evidence for an epididymal origin of bovine sperm forward motility protein. **Biology of Reproduction**, v.19, p.830-835, 1978.
- BRIZ, M.D.; BONET, S.; CAMPS, R. Sperm malformations throughout the boar epididymal duct. **Animal Reproduction Science**, v.43, p.221-239, 1996.
- BRUEMMER, J.E.; REGER, H.; ZIBINSKI, G.; SQUIRES, E.L. Effect of storage at 5°C on the motility and cryopreservation of stallion epididymal spermatozoa. **Theriogenology**, v.58, p.405-407, 2002.
- CARD, C. Cellular associations and the differential spermogram: Making sense of stallion spermatozoal morphology. **Theriogenology**, v.64, p.558-567, 2005.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2. ed. Belo Horizonte, 1998. 49p.
- COMIZZOLI, P.; MERMILLOD, P.; COGNIE, Y.; CHAI, N.; LEGENDRE, X.; MAUGE, R.; Successful in vitro production of embryos in the red deer (*Cervus elaphus*) and the sika deer (*Cervus nippon*). **Theriogenology**, v.55, p.649-659, 2001.

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

DACHEUX, J.L.; PAQUIGNON, M. Relations between the fertilizing ability, motility and metabolism of epididymal spermatozoa. **Reproduction and Nutrition Development**, v.20, p.1085-1099, 1980.

ENGLAND, G.C.W. Cryopreservation of dog semen: a review. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v.47, p.725-733, 1993.

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

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

GOOVAERTS, I.G.F.; HOFACK, G.G.; VAN SOOM, A.; DEWULF, J.; NICHI, M.; KRUIF, A.; BOLS, P.E.J. Evaluation of epididymal semen quality using the Hamilton-Thorne analyzer indicates variation between the two caudae epididymides of same bull. **Theriogenology**, article in press.

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

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

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

HORAN, A.H.; BEDFORD, J.M. Development of the fertilizing ability of spermatozoa in the epididymis of the Syrian hamster. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.30, p.417-423, 1972.

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

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

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

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

JOHNSON, L.; BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D.; SCRUTCHFIELD, W.L. Factors affecting spermatogenesis in the stallion. **Theriogenology**, v.48, p.1199-1216, 1997.

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

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

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

KIKUCHI, K.; KASHIWAZAKI, N.; NAGAI, T.; NOGUCHI, J.; SHIMADA, A.; TAKAHASHI, R.; HIRABASHI, M.; SHINO, M.; UEDA, M.; KANEKO, H. Reproduction in pigs using frozen-thawed spermatozoa from epididymis stored at 4°C. **Journal of Reproduction**, v.45, p.345-349, 1999.

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

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

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

LIMONE, L.E.; SHAUGHMESSY, D.W.; GÓMEZ-IBÁÑEZ, S.; MCDONNELL, S.M.; BEDFORD, S.J. The effect of artificial vagina lubricants on stallion sperm motion measures and semen pH during cooled storage. **Theriogenology**, v.58, p.333-336, 2002.

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

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

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

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

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

MOGHADAM, K.K.; NETT, R.; ROBINS, J.C.; THOMAS, M.A.; AWADALLA, S.G.; SCHEIBER, M.D.; WILLIAMS, D.B. The motility of epididymal or testicular spermatozoa does not directly affect IVF/ICSI pregnancy outcomes. **Journal of Andrology**, v.26, p.619, 2005.

MOORE, H.D.; AKHONDI, A. Fertilizing capacity of rat spermatozoa is correlated with decline in straight-line velocity measured by continuous computer-aided sperm analysis. **Journal of Andrology**, v.17, p.50-60, 1996.

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

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

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

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

SAID, S.; HAN, M.S.; NIWA, K. Development of rat oocytes following intracytoplasmic injection of sperm heads isolated from testicular and epididymal spermatozoa. **Theriogenology**, v.60, p.359-369, 2003.

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

SEAGER, S.W.J.; PLATZ, C.C. Collection and evaluation of canine semen. **Veterinary clinicians of North American**, v.7, p.765-773, 1977.

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

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, L.D.M.; Avanços na inseminação artificial na espécie canina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.24, n.4, p.194-201, 2000.

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

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

SQUIRES, E.L. Integration of future biotechnologies into the equine industry. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.187-198, 2005.

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

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.

WILDT, D.E.; SCHIEWE, M.; SCHMIDT, P.; GOODROWE, K.; HOWARD, J.; PHILLIPS, L.; O'BRIEN, S.; BUSH, M. Developing animal model systems for embryo technologies in rare and endangered wildlife. **Theriogenology**, v.25, p.33-51, 1986.

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

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.