

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

TÁCIA GOMES BERGSTEIN GALAN



**PRESERVAÇÃO E FERTILIDADE DE ESPERMATOZOIDES OVINOS  
RECUPERADOS DE EPIDÍDIMOS MANTIDOS À TEMPERATURA AMBIENTE (18  
A 25°C) ATÉ 48 HORAS *POST MORTEM*.**

CURITIBA

2017

TÁCIA GOMES BERGSTEIN GALAN

**PRESERVAÇÃO E FERTILIDADE DE ESPERMATOZOIDES OVINOS  
RECUPERADOS DE EPIDÍDIMOS MANTIDOS À TEMPERATURA AMBIENTE (18  
A 25°C) ATÉ 48 HORAS *POST MORTEM*.**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção de grau de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Romildo Romualdo Weiss  
Co-orientador: Prof. Dr. Sony Dimas Bicudo

CURITIBA

2017

---

G146p

Galan, Tácia Gomes Bergstein

Preservação e fertilidade de espermatozoides ovinos recuperados de epidídimos mantidos à temperatura ambiente (18 a 25°C) até 48 horas post mortem / Tácia Gomes Bergstein Galan. – Curitiba, 2017.

103 f. : il. color. ; 30 cm.

- Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, 2017.

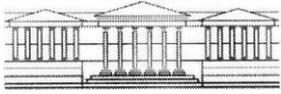
Orientador: Romildo Romualdo Weiss.

Coorientador: Sony Dimas Bicudo.

1. Biotecnologia. 2. Epidídimo (carneiro). 3. Plasma seminal.  
I. Universidade Federal do Paraná. II. Weiss, Romildo Romualdo.  
III. Bicudo, Sony Dimas. IV. Título.

CDD: 660.6

---



## MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

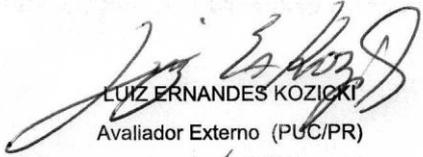
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
Setor TECNOLOGIA  
Programa de Pós Graduação ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E  
BIOTECNOLOGIA

### TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **TACIA GOMES BERGSTEIN** intitulada: "**Preservação e fertilidade de espermatozoides ovinos recuperados de epididimos mantidos à temperatura ambiente até 48 horas post mortem**", após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO.

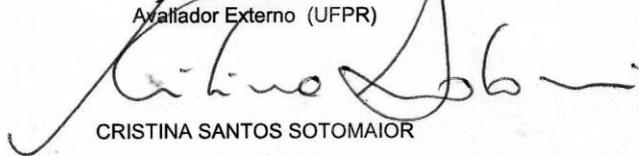
Curitiba, 13 de Abril de 2017.

  
ROMILDO ROMUALDO WEISS  
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

  
LUIZ ERNANDES KOZICKI  
Avaliador Externo (PUC/PR)

  
IVO WALTER DOS SANTOS  
Avaliador Externo (UFPR)

  
MELINA ANDREA FORMIGHIERI BERTOL  
Avaliador Externo (UFPR)

  
CRISTINA SANTOS SOTOMAIOR

---

*À minha família Fabricio, Eduardo, Marta, Laís e Renan, minha fortaleza e meus amores, dedico esta tese.*

## AGRADECIMENTOS

Quando criança a única profissão que dividia o meu coração com a Medicina Veterinária era a de cientista. Imaginem vocês qual foi a minha surpresa quando, em algum momento deste doutorado, percebi que havia me tornado os dois. Entretanto não realizei este sonho sozinha, por isso agradeço...

Aos meus amados pais, Eduardo e Marta, que me apoiaram da forma mais ampla possível. Palavras não são suficientes para agradecer o incentivo, o amor e o cuidado.

Ao meu marido Fabrício, que acredita em meu potencial mais que eu mesma, seu apoio e carinho nas horas de incerteza, tão comuns a quem trilha caminhos incertos, foram e são essenciais.

À minha irmã Laís e meu cunhado Renan pelos incentivos constantes e por serem exemplos de determinação, persistência e empenho.

Ao meu orientador, amigo e mestre Professor Romildo, que me deu a oportunidade de voltar para casa, além de ensinamentos e conselhos que carregarei por toda a vida. *Vielen dank!*

Ao meu co-orientador, amigo e mestre Professor Sony, por me inserir na Ciência da reprodução animal e assim mudar a minha forma de entender a profissão, por estar sempre disposto a ajudar, pela amizade e carinho.

À Álamos Agronegócios, Genética e Part LTDA, pelo financiamento deste projeto e por ser minha fonte inspiradora e motivacional.

Às Instituições e às pessoas do Centro de Estudos em Biotecnologia Aplicada à Reprodução de Ovinos e Caprinos-FMVZ-UNESP-Botucatu, do Programa de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia-UFPR e do Departamento de Medicina Veterinária-UFPR, por possibilitarem a realização deste trabalho.

À minha família e meus amigos, pela torcida, apoio e acalanto. Todos vocês são a base do meu ser e da minha persistência.

Aos animais, participantes ou não deste experimento, por nortearem a minha vida profissional e reforçarem, com seus gestos, a minha motivação.

A todos que de alguma forma participaram da realização deste trabalho e desta fase da minha vida, muito obrigada!

“A religião sem a ciência é manca, e a ciência sem religião é cega.”

Albert Einstein

## RESUMO

Os objetivos deste trabalho foram avaliar o período máximo para recuperação e preservação (refrigeração à 5°C e criopreservação) e o efeito da adição de 20% de plasma seminal aos diluidores para refrigeração e criopreservação dos espermatozoides ovinos coletados de epidídimos mantidos à temperatura ambiente (18-25°C) até 48 horas após a morte, além de identificar suas subpopulações espermáticas. Dez carneiros foram utilizados para coleta de sêmen em vagina artificial (AV) e posteriormente foram sacrificados para recuperação de espermatozoides da cauda do epidídimo 0 (G0), 6(G6), 12(G12), 24(G24) e 48 (G48) horas após a morte. Foram feitas análise de motilidade total (TM), motilidade progressiva (PM), morfologia e resistência ao teste hiposmótico (HOST) nas amostras a fresco. Foram realizadas análises de cinética espermática em sistema automatizado (*Computer Assisted Sperm Analysis* - CASA), reação acrossomal, integridade e estabilidade de membrana plasmática em citometria de fluxo nas amostras criopreservadas. Foi realizada a inseminação artificial (AI) laparoscópica em cem ovelhas com amostras descongeladas e exame ultrassonográfico para diagnóstico de gestação 60 dias após a AI. A análise estatística foi realizada com as médias dos parâmetros avaliados, e a análise multivariada da cinética espermática foi utilizada para identificar subpopulações espermáticas. Não foram encontradas diferenças significativas nas médias dos parâmetros avaliados a fresco ou após criopreservação entre o sêmen coletado em AV ou espermatozoides epididimários. Concluímos que é possível recuperar espermatozoides da cauda de epidídimos expostos à temperatura ambiente até 48 horas após a morte, contudo a motilidade total decresce ( $P < 0,05$ ) a partir de 24 horas pós-morte. A preservação espermática (refrigeração e criopreservação) foi viável quando os espermatozoides foram recuperados até 24 horas após a morte. A adição de 20% de plasma seminal aos diluidores não apresentou efeito positivo sobre os espermatozoides após refrigeração ou criopreservação. A taxa de gestação após AI não diferiu ( $P > 0,05$ ) entre os grupos estudados. Foi possível identificar três subpopulações espermáticas com base na cinética das amostras avaliadas. O período *post mortem* e a adição de 20% de plasma seminal influenciaram de forma negativa a porcentagem das subpopulações espermáticas. Não foi encontrada correlação significativa ( $P > 0,05$ ) entre as subpopulações espermáticas e a fertilidade após AI nas condições deste estudo.

**Palavras-chave:** epidídimo, carneiro, plasma seminal, preservação

## ABSTRACT

The objectives of this work were to evaluate the maximum period for recovery and preservation (refrigeration at 5 ° C and cryopreservation) and the effect of the addition of 20% of seminal plasma to the diluents for refrigeration and cryopreservation of ovine spermatozoa collected from epididymites kept at room temperature (18-25°C) up to 48 hours after death, and to identifying their spermatid subpopulations. Ten rams were used for collection of semen in an artificial vagina (AV) and were slaughtered for the recovery of spermatozoa from the epididymis cauda 0 (G0), 6 (G6), 12 (G12), 24 (G24) and 48 (G48) hours after death. Total motility (TM), progressive motility (PM), morphology and resistance to hyposmotic swelling test (HOST) were analyzed in fresh samples. Sperm kinetics in automated system (Computer Assisted Sperm Analysis - CASA), acrosomal reaction, plasma membrane integrity and stability were performed in flow cytometry in cryopreserved samples. Laparoscopic artificial insemination (AI) was performed on 100 sheep with thawed samples and ultrasonographic examination for diagnosis of pregnancy were performed 60 days after AI. Statistical analysis were performed using the means of the parameters evaluated, and the multivariate analysis of sperm kinetics were used to identify sperm subpopulations. No significant differences were found in parameters means of fresh samples or after cryopreservation between the semen collected in AV or epididymal spermatozoa. We conclude that it is possible to recover spermatozoa from the tail of epididymis exposed to room temperature up to 48 hours after death, but total motility decreases ( $P < 0.05$ ) after 24 hours *postmortem*. Sperm preservation (refrigeration and cryopreservation) was justified when spermatozoa were recovered up to 24 hours after death. The addition of 20% of seminal plasma to the diluents had no positive effect on the spermatozoa after refrigeration or cryopreservation. The gestation rate after AI did not differ ( $P > 0.05$ ) between the groups. It was possible to identify three sperm subpopulations in the samples evaluated. The *postmortem* time and the addition of 20% of seminal plasma influenced negatively the percentage of sperm subpopulations. No significant correlation ( $P > 0.05$ ) was found between spermatid subpopulations and fertility after AI.

**Key words:** epididymis, sheep, seminal plasma, preservation

## LISTA DE FIGURAS

### ARTIGO I

FIGURA 1. GRÁFICO DA MOTILIDADE TOTAL NO SÊMEN COLETADO EM VAGINA ARTIFICIAL (AV) E ESPERMATOZOIDES COLETADOS DE EPIDÍDIMOS 0, 6, 12, 24 E 48 HORAS APÓS A MORTE E REFRIGERADO A 5°C POR 0, 6, 12, 24, 48 E 72 HORAS.....37

FIGURA 2. GRÁFICO DAS MÉDIAS E DESVIO PADRÃO DO HOST (% ÍNTEGROS) NO SÊMEN COLETADO EM VAGINA ARTIFICIAL (AV) E ESPERMATOZOIDES COLHIDOS DE EPIDÍDIMOS 0, 6, 12, 24 E 48 HORAS APÓS A MORTE E REFRIGERADO A 5°C POR 0, 6, 12, 24, 48 E 72 HORAS.....38

### ARTIGO III

FIGURA 1. ANÁLISE HIERÁRQUICA, GRÁFICO DA DISTÂNCIA ENTRE CLUSTERS E DELIMITAÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES.....74

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO I

- TABELA 1. MÉDIAS  $\pm$  DESVIO PADRÃO DA CONCENTRAÇÃO ( $\times 10^6$  ESPERMATOZOIDES/ML), VOLUME (ML) E CONCENTRAÇÃO TOTAL (CONC TOTAL  $\times 10^6$ ) NO SÊMEN COLETADO EM VAGINA ARTIFICIAL, E ESPERMATOZOIDES COLHIDOS DE EPIDÍDIMOS 0, 6, 12, 24 E 48 HORAS APÓS A MORTE.....35
- TABELA 2. MÉDIA  $\pm$  DESVIO PADRÃO DA MOTILIDADE TOTAL (TM %), MOTILIDADE PROGRESSIVA (PM %), INTEGRIDADE DE MEMBRANA PLASMÁTICA (HOST %ÍNTEGROS), DEFEITOS DE ACROSSOMA (%) E DEFEITOS DE CAUDA (%) NO SÊMEN COLETADO COM VAGINA ARTIFICIAL (AV) E COLHIDOS DE EPIDÍDIMOS 0, 6, 12, 24 E 48 HORAS APÓS A MORTE.....36

### ARTIGO II

- TABELA 1. MÉDIA  $\pm$  DESVIO PADRÃO DA TM(%), PM (%), VIABILIDADE (%), YOPRO-), LESÃO DE ACROSSOMA (%), FIT-PSA+) E INSTABILIDADE DE MEMBRANA PLASMÁTICA (%), M540+) DAS AMOSTRAS DESCONGELADAS COLETADAS EM VAGINA ARTIFICIAL (AV) E DA CAUDA DE EPIDÍDIMOS MANTIDOS À TEMPERATURE AMBIENTE 0, 6, 12, 24 E 48 HORAS *POST MORTEM*.....54
- TABELA 2. MÉDIA  $\pm$  DESVIO PADRÃO DA VAP( $\mu$ M/S), VSL(M/S), VCL( $\mu$ M/S), ALH( $\mu$ M), BCF(HZ), STR (%) E LIN (%) DAS AMOSTRAS DESCONGELADAS COLETADAS EM VAGINA ARTIFICIAL (AV) E DA CAUDA DE EPIDÍDIMOS MANTIDOS À TEMPERATURE AMBIENTE 0, 6, 12, 24 E 48 HORAS *POST MORTEM*.....55
- TABELA 3. MÉDIA  $\pm$  DESVIO PADRÃO DA TM (%), PM (%), VIABILIDADE (%), YOPRO-), LESÃO DE ACROSSOMA (%), FIT-PSA+), ESPERMATOZOIDES COM INSTABILIDADE DE MEMBRANA PLASMÁTICA(%), M540+), NÚMERO DE OVELHAS GESTANTES AOS 60 DIAS E NÚMERO DE OVELHAS INSEMINADAS E TAXA DE GESTAÇÃO DAS AMOSTRAS CONGELADAS COM MEIO CONTROLE(CM) E CM

ADICIONADO 20% DE PLASMA SEMINAL (SP), COLETADAS EM VAGINA ARTIFICIAL (AV) E DA CAUDA DE EPIDÍDIMOS MANTIDOS EM TEMPERATURA AMBIENTE POR 0, 6, 12, 24 E 48 HORAS APÓS A MORTE.....56

### ARTIGO III

TABELA 1. VARIÂNCIA, PORCENTAGEM DE DADOS (%), PORCENTAGEM DE DADOS ACUMULADA (%) E AUTOVETORES IDENTIFICADOS NA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS DA VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, STR, LIN.....73

TABELA 2. MÉDIA  $\pm$  DESVIO PADRÃO DA VAP( $\mu$ M/S), VSL(M/S), VCL( $\mu$ M/S), ALH( $\mu$ M), BCF(HZ), STR (%) E LIN (%) DAS SUBPOPULAÇÕES 1(SP1), 2(SP2) E 3(SP3) IDENTIFICADAS NA ANÁLISE MULTIVARIADA DO SÊMEN OVINO COLHIDO EM VAGINA ARTIFICIAL E ESPERMATOZOIDES OVINOS RECUPERADOS DA CAUDA DE EPIDÍDIMO ATÉ 48 HORAS APÓS A MORTE.....74

TABELA 3. PORCENTAGEM (%) DAS SUBPOPULAÇÕES 1 (SP1), 2 (SP2) e 3 (SP3) APÓS DESCONGELAÇÃO DO SÊMEN OVINO COLHIDO EM VAGINA ARTIFICIAL (AV) E ESPERMATOZOIDES RECUPERADOS DA CAUDA DE EPIDÍDIMOS MANTIDOS À TEMPERATURA AMBIENTE POR 0(G0), 6(G6), 12(G12), 24(G24), 48(G48) HORAS APÓS A MORTE E CRIOPRESERVADAS EM MEIO CONTROLE (CM) E MEIO CONTROLE COM ADIÇÃO DE 20% DE PLASMA SEMINAL (SP).....75

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

µg/mL- microgramas por mililitro

µL- microlitros

µm- micrometros

µm/s- micrometros por segundo

°C – graus Celsius

AI- Inseminação Artificial

ALH- Amplitude de deslocamento lateral de cabeça

AV- vagina artificial

BCF- Frequência de batimentos do flagelo

BSA- *Bovine Serum Albumin*

CASA- *Computer Assisted Sperm Analysis*

CASMA- *Computer Assisted Sperm Morphometry Analyses*

CM- Meio controle

CONC TOTAL- Concentração total

Ex-EPID- fora do epidídimo

FITC-PSA- aglutinina do *Pisum sativum* conjugada ao Isotiocionato de Fluoresceína

FIV- Fertilização in vitro

H324- Hoechst 33342

HOST- teste hiposmótico

In-EPID- dentro do epidídimo

IP- Iodeto de Propídio

LIN- Linearidade

M540- Merocianina 540

mL- mililitros

mL/Kg- mililitros por quilograma

mM- milimolar

PM- motilidade progressiva

PC1 - componente principal um

PC2 - componente principal dois

ROS- espécies reativas do oxigênio

SP- Meio diluidor com 20% de plasma seminal

SP1 - subpopulação um

SP2 - subpopulação dois

SP3 - subpopulação três

STR- Retilinearidade

TM- Motilidade total

VAP- Velocidade de trajeto

VCL- Velocidade curvilinear

VSL- Velocidade progressiva

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>17</b>
2.1. Gerais.....	17
2.2. Específicos.....	17
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>18</b>
3.1. Espermatozoides epididimários .....	18
3.2. Preservação de espermatozoides epididimários.....	20
3.2.1. Refrigeração de espermatozoides epididimários .....	20
3.2.2. Criopreservação de espermatozoides epididimários .....	22
3.3. Fertilidade de espermatozoides epididimários .....	23
3.4. Plasma seminal.....	24
3.4.1. Adição de plasma seminal a espermatozoides epididimários .....	25
3.5. Análise de subpopulações espermáticas .....	27
<b>ARTIGO I .....</b>	<b>30</b>
<b>VIABILIDADE DOS ESPERMATOZOIDEOS COLHIDOS DE EPIDÍDIMOS DE OVINOS E ARMAZENADOS A 18°C-25°C POR 48 HORAS POST MORTEM.....</b>	<b>30</b>
1. Introdução .....	31
2. Material e métodos .....	32
2.1. Projeto experimental .....	32
2.2. Meios diluidores .....	33
2.3. Coleta dos espermatozoides da cauda de epidídimo .....	33
2.4. Avaliação espermática.....	34
2.5. Estatística .....	35
3. Resultados.....	35
3.1. Recuperação espermática .....	35
3.2. Viabilidade espermática post mortem .....	36
3.3. Refrigeração espermática .....	36
3.4. Meios diluidores .....	38
4. Discussão .....	39
4.1 . Conclusões .....	41
REFERÊNCIAS.....	42
<b>ARTIGO II .....</b>	<b>46</b>

<b>QUALIDADE E FERTILIDADE DE ESPERMATOZOIDES CONGELADOS RECUPERADOS DE EPIDÍDIMOS OVINOS ARMAZENADOS EM TEMPERATURA AMBIENTE (18-25°C) ATÉ 48 HORAS APÓS A MORTE .....</b>	<b>46</b>
1. Introdução .....	47
2. Material e métodos .....	48
2.1. Projeto do experimento .....	48
2.2. Coleta dos espermatozoides após a morte .....	49
2.3. Criopreservação .....	49
2.4. Avaliação espermática .....	50
2.4.1. Cinética espermática .....	50
2.4.2. Citometria de fluxo .....	51
2.4.2.1. Viabilidade espermática e integridade da membrana acrossomal .....	51
2.4.2.2. Viabilidade espermática e estabilidade de membrana plasmática .....	52
2.5. Inseminação artificial .....	52
2.6. Análise estatística .....	53
3. Resultados .....	53
3.1. Recuperação espermática .....	53
3.2. Análises pós-descongelação .....	54
3.3. Meios diluidores e fertilidade .....	55
4. Discussão .....	56
4.1. Conclusões .....	60
REFERÊNCIAS .....	60
<b>ARTIGO III .....</b>	<b>66</b>
<b>SUBPOPLUAÇÕES ESPERMÁTICAS DE ESPERMATOZOIDES RECUPERADOS DE EPIDÍDIMOS DE CARNEIROS ATÉ 48 HORAS APÓS A MORTE. ....</b>	<b>66</b>
1. Introdução .....	67
2. Material e métodos .....	68
2.1. Projeto do experimento .....	68
2.2. Coleta dos espermatozoides da cauda de epidídimo .....	69
2.3. Criopreservação .....	69
2.4. Análise de Cinética Espermática Assistida por Computador .....	70
2.5. Inseminação artificial .....	71
2.6. Estatística .....	71
3. Resultados .....	72
4. Discussão .....	76
4.1. Conclusões .....	80

REFERÊNCIAS.....	80
<b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>85</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>87</b>
<b>APÊNDICE 1 – Fluxograma do experimento .....</b>	<b>99</b>
<b>ANEXO 1 – Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais.....</b>	<b>100</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A crescente valorização da espécie ovina no cenário nacional tem motivado pesquisas direcionadas a este setor. Porém, tratando-se de uma cultura ainda em crescimento, é clara a necessidade de investimentos na melhoria genética do rebanho nacional. É necessário multiplicar reprodutores e matrizes de genótipos superiores de forma a permitir os avanços produtivos (Lobo e Lobo, 2007).

A recuperação de espermatozoides da cauda de epidídimo *post mortem* pode ser a última chance de obter o material genético de reprodutores de genótipos superiores (García-Alvarez et al., 2009; Monteiro et al., 2013). No entanto, a falta de conhecimento técnico sobre o período máximo no qual é possível recuperar espermatozoides viáveis de epidídimos mantidos à temperatura ambiente, por vezes, impede sua preservação.

A cauda do epidídimo em mamíferos é responsável pelo armazenamento de espermatozoides, no macho, até o momento da ejaculação e promove um ambiente favorável às células, preservando sua capacidade de fertilização por algumas semanas (Jones, 2004). Após a morte, os espermatozoides em machos e os oócitos em fêmeas permanecem viáveis por algum tempo (Martins et al., 2009). Estudos relatam que é possível recuperar espermatozoides viáveis após a morte da cauda de epidídimo em diversas espécies (Kaabi et al., 2003; Martinez-Pastor et al., 2006a; Weiss et al., 2008). Quando recuperados pouco tempo após a morte, os espermatozoides da cauda do epidídimo demonstram a mesma qualidade do sêmen colhido em vagina artificial (Álvarez et al., 2012) e melhor qualidade quando comparado ao sêmen colhido por eletro ejaculação (García-Álvarez et al., 2009). A recuperação espermática após a morte tem aplicações importantes na manutenção de bancos de germoplasma de animais de interesse zootécnico que morreram inesperadamente e em espécies ameaçadas de extinção (Kaabi et al., 2003).

O tempo entre a morte e a recuperação dos espermatozoides da cauda do epidídimo, além da temperatura de manutenção do órgão desde o óbito até a coleta e criopreservação, interferem na viabilidade e congelabilidade da amostra espermática (Bertol et al., 2013; Martins et al., 2009). Em temperatura ambiente, a motilidade dos espermatozoides ovinos recuperados de epidídimos decresce antes de 24 horas após a morte (Kaabi et al., 2003) e espermatozoides bovinos têm a motilidade diminuída,

em relação ao sêmen colhido por eletroejaculação, a partir de trinta horas após a orquiectomia (Bertol et al., 2013). Quando os epidídimos são refrigerados, o período pelo qual os espermatozoides epididimários permanecem viáveis aumenta significativamente (Tamayo-Canul et al., 2011; Monteiro et al., 2013). Porém, quando os animais morrem inesperadamente é comum encontrá-los após terem sido expostos à temperatura ambiente por, ao menos, algumas horas.

A preservação do sêmen pode ser realizada pelo método de refrigeração ou criopreservação. A refrigeração prolonga a viabilidade espermática de ovinos até 48 horas após a coleta (Bergstein-Galan et al., 2016). A grande vantagem da refrigeração é que este método diminui os efeitos do choque térmico, comuns na criopreservação, que causam lesões irreversíveis às células espermáticas quando atingem temperaturas próximas a 0°C (Salamon e Maxwell, 1995). Em contrapartida, a criopreservação é o método de preservação espermática definitivo, mantendo a viabilidade espermática por tempo indeterminado. Os métodos de preservação dos espermatozoides recuperados da cauda de epidídimo parecem apresentar peculiaridades quando comparados ao sêmen colhido em vagina artificial ou eletroejaculação, principalmente quanto à resistência ao choque térmico e à osmolaridade (Tamayo-Canul et al., 2011; Alvarez et al., 2012).

O plasma seminal é a secreção mista das glândulas do trato reprodutivo masculino e é misturado aos espermatozoides no momento da ejaculação (Domínguez et al., 2008). Estudos relatam que o plasma seminal possui proteínas que regulam a função espermática (Luna et al., 2015; Mehr et al., 2015). Alguns autores identificaram que a adição do plasma seminal durante o processamento dos espermatozoides epididimários teria efeitos benéficos sobre a motilidade (Graham, 1994) e fertilidade da amostra (Rickard et al., 2014). De forma contraditória, outros autores relataram que a adição de plasma seminal é prejudicial à sobrevivência espermática em cães, ovinos e bovinos (Dott et al., 1979). O plasma seminal pode ser facilmente recuperado de ejaculados ovinos em propriedade rurais e, caso apresente efeito positivo sobre as células espermáticas, seria um aditivo barato, simples e econômico. Até onde se sabe, não existem relatos da fertilidade de espermatozoides ovinos recuperados de epidídimo e criopreservados na presença de plasma seminal.

O sêmen é composto por população heterogênea de espermatozoides (Holt e Van Look, 2004) que varia conforme a cinética e a morfologia espermática (Rodríguez-

Martínez et al., 2006). A utilização de testes estatísticos de agrupamento somados à obtenção de dados cinéticos e morfológicos individuais dos espermatozoides permite a classificação das células espermáticas presentes em uma amostra em subpopulações com características similares denominadas “subpopulações espermáticas”(Martínez-Pastor et al., 2011). A análise de subpopulações espermática é mais acurada e sensível quando comparada à análise de médias (Bravo et al., 2011), pois classifica as células da amostra em padrões de movimento ou morfologia condizentes à espermatozoides com potencial fecundativo. Este tipo de análise estatística tem sido utilizada em diversas espécies (Quintero-Moreno et al., 2003; Martí et al., 2011; D’Amours et al., 2012) para estudos de congelabilidade(Martinez-Pastor et al., 2005b; Dorado et al., 2011), efeitos da estação reprodutiva (Martinez-Pastor et al., 2005a) e fertilidade (Maroto-Morales et al., 2015). Até onde se sabe não existem relatos da identificação de subpopulações espermáticas nos espermatozoides ovinos recuperados da cauda de epidídimo.

Com o intuito de preencher as lacunas sobre o período máximo de viabilidade dos espermatozoides de ovinos recuperados da cauda de epidídimos mantidos à temperatura ambiente, suas peculiaridades frente aos métodos de preservação e o efeito da adição do plasma seminal nas etapas do processamento, o presente trabalho está dividido em quatro capítulos: Revisão bibliográfica, Artigo I(Viabilidade dos espermatozoides colhidos de epidídimos de ovinos e armazenados a 18°C-25°C por 48 horas post mortem), Artigo II(Qualidade e fertilidade de espermatozoides congelados recuperados de epidídimos ovinos armazenados em temperatura ambiente (18°C-25°C) até 48 horas após a morte) e Artigo III(Subpopulações espermáticas de espermatozoides recuperados de epidídimos de carneiros até 48 horas após a morte). Afim de facilitar o entendimento sobre o delineamento experimental do estudo um fluxograma está contido como apêndice desta tese.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Gerais

- Avaliar a viabilidade dos espermatozoides ovinos coletados da cauda do epidídimo mantido à temperatura ambiente (18-25°C) até 48 horas após a morte.
- Identificar subpopulações espermáticas, com base na cinética, dos espermatozoides epididimários ovinos.
- Estudar o efeito da adição de plasma seminal homólogo ao meio diluidor para refrigeração e criopreservação de espermatozoides recuperados da cauda de epidídimos de ovinos.

### 2.2. Específicos

- Investigar o período máximo de viabilidade dos espermatozoides ovinos após diluição e refrigeração a 5°C quando recuperados de epidídimos mantidos à temperatura ambiente até 48 horas após a morte.
- Avaliar a congelabilidade dos espermatozoides ovinos coletados de epidídimos mantidos à temperatura ambiente até 48 horas *post mortem*.
- Aferir a fertilidade dos espermatozoides ovinos após descongelação quando mantidos estocados na cauda de epidídimos à temperatura ambiente até 48 horas após a morte.
- Estimar a variação da porcentagem das subpopulações espermáticas de espermatozoides epididimários quanto ao período *post mortem*.
- Correlacionar as subpopulações espermáticas encontradas com a fertilidade após inseminação artificial intrauterina.
- Aferir o efeito da adição de 20% de plasma seminal aos meios diluidores de refrigeração e criopreservação sobre viabilidade e fertilidade e porcentagem das subpopulações espermáticas de espermatozoides ovinos colhidos da cauda de epidídimo.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Espermatozoides epididimários

O epidídimo compõe o aparelho reprodutivo masculino e é anatomicamente dividido em três porções: cabeça, corpo e cauda. Durante o trânsito das células espermáticas pela cabeça e corpo do epidídimo ocorre a maturação espermática pós-testicular, que compreende modificações da membrana plasmática além da aquisição e desprendimento de proteínas de superfície dos espermatozoides (Vernet et al., 2004). A cauda do epidídimo é responsável pela estocagem de espermatozoides, por um longo período de tempo, até o momento da ejaculação, (Fernández-Santos et al., 2009).

A obtenção de espermatozoides colhidos da cauda de epidídimo de animais após a morte ou após a orquiectomia é uma opção viável para a preservação dos gametas de um reprodutor importante ou para a manutenção de bancos de germoplasma (Kaabi et al., 2003; Tittarelli et al., 2006). A prática de coleta de espermatozoides após a morte é principalmente interessante para espécies de vida livre ou ameaçadas de extinção quando a coleta do sêmen antes da morte não é possível, contribuindo com a manutenção da biodiversidade (Kaabi et al., 2003; Cseh et al., 2012; Abella et al., 2015). A coleta de espermatozoides viáveis da cauda de epidídimo já foi relatada em equinos (Melo et al., 2008; Weiss et al., 2008; Vieira et al., 2013), bovinos (Martins et al., 2009; Bertol et al., 2013; Bertol et al., 2016), suínos (Kikuchi et al., 1998), ovinos (Kaabi et al., 2003; Álvarez et al., 2012), caprinos (Blash et al., 2000), cervídeos (Martínez-Pastor et al., 2006; Martínez et al., 2008; Lone et al., 2011), caninos e felinos (Tittarelli et al., 2006).

Os espermatozoides provenientes da cauda de epidídimo apresentam viabilidade e fertilidade similares ao sêmen colhido com vagina artificial (Álvarez et al., 2012) e superiores ao sêmen coletado por eletroejaculação (García-Álvarez et al., 2009). Porém, a viabilidade espermática diminui conforme aumenta o tempo *post mortem*. Esta depreciação é resultado do envelhecimento dos espermatozoides e do processo de degeneração e decomposição tecidual dos epidídimos (Martínez-Pastor et al.,

2005a). Estudos em ratos revelaram que alterações testiculares degenerativas iniciam aproximadamente seis horas após a morte do animal, porém, no epidídimo, essas alterações só iniciam 12 horas após a morte (Songsasen et al., 1998).

Martinez-Pastor et al. (2005a) recuperaram sêmen da cauda de epidídimo de corças e veados vermelhos e estudaram a correlação entre o período de tempo entre a morte e a análise de diversos parâmetros de avaliação *in vitro* do sêmen. Esses autores identificaram correlações negativas moderadas entre o período de tempo e a motilidade total (TM)( $r=-0,54$ ), motilidade progressiva (PM)( $r=-0,52$ ) e deslocamento lateral de cabeça (ALH)( $r=-0,41$ ) e correlação negativa fraca nos parâmetros velocidade de trajeto (VAP)( $r=-0,36$ ), retilinearidade (STR) ( $r=-0,35$ ), lesão de acrossoma ( $r=-0,21$ ) e viabilidade ( $r=-0,26$ ). Entretanto as correlações foram estudadas quando os epidídimos eram mantidos refrigerados a 5°C. Em ovinos, outros autores relataram que a correlação entre o período de tempo após a morte e motilidade total dos espermatozoides colhidos da cauda de epidídimo mantido em temperatura ambiente é de -0,60 (Barbosa et al. 2016).

O período máximo que os espermatozoides epididimários podem ser expostos à temperatura ambiente e mantêm-se viáveis varia conforme a espécie. Em equinos, a viabilidade diminuiu a partir de seis horas após a orquiectomia (Monteiro et al. 2013). Em ovinos, estudos relatam que, antes das 24 horas *post mortem*, ocorre o decréscimo da qualidade espermática, porém, diferenças na fertilidade dos espermatozoides só ocorrem 48 horas após a morte (Kaabi et al., 2003). Em bovinos, pesquisadores relatam que 6 horas após a orquiectomia os espermatozoides recuperados de epidídimos, mantidos à temperatura ambiente, apresentam motilidade total menor quando comparado ao sêmen colhido por eletroejaculação, porém, os defeitos morfológicos aumentam somente a partir de 12 após a morte (Bertol et al., 2013). Toyonaga e Tsutsui (2012) demonstraram que os espermatozoides felinos podem ser recuperados até 12 horas após a morte, quando os epidídimos são mantidos à temperatura ambiente.

A temperatura em que os epidídimos são mantidos interfere na viabilidade das amostras seminais (Kaabi et al., 2003). Em países com dimensões continentais, quando um animal geneticamente superior morre inesperadamente, na maioria das vezes não existem técnicos e/ou equipamentos disponíveis para recuperar e criopreservar o sêmen em um curto período de tempo (Martins et al., 2009), logo,

estudos sobre a preservação dos espermatozoides têm sido realizados a fim de aumentar o período de viabilidade após a coleta dos espermatozoides recuperados da cauda de epidídimo.

### 3.2. Preservação de espermatozoides epididimários

A preservação do sêmen pode ser realizada pela diminuição ou paralisação do metabolismo espermático promovido pela diminuição de temperatura e conseqüentemente prolongamento da viabilidade e fertilidade. Os métodos de preservação espermática são a refrigeração e a criopreservação (Salamon e Maxwell, 2000).

#### 3.2.1. Refrigeração de espermatozoides epididimários

A refrigeração espermática prolonga, em horas ou dias, a viabilidade dos espermatozoides sem que haja danos causados pelo processo de criopreservação. Quando o sêmen ovino é refrigerado, este pode ser armazenado até 48 horas após a coleta (Moscardini et al., 2014; Bergstein-Galan et al., 2016), porém, a fertilidade diminui após 24 horas de refrigeração na inseminação artificial cervical (O'Hara et al., 2010). A refrigeração dos espermatozoides da cauda de epidídimo pode ser realizada de duas formas: quando o complexo testículo-epidídimo é refrigerado inteiro ou quando os espermatozoides são recuperados e posteriormente refrigerados.

Existe um consenso entre os autores de que a refrigeração do epidídimo a 5°C, antes da recuperação espermática, aumenta o período de viabilidade dos espermatozoides recuperados (Fernández-Santos et al., 2009; Maroto-Morales et al., 2010; Monteiro et al., 2013b; Nichi et al., 2016; O'Hara et al., 2010). Em ovinos, quando os epidídimos são refrigerados, os espermatozoides recuperados não apresentam alterações significativas pelo período de 24 horas (Kaabi et al., 2003; Tamayo-Canul et al., 2011). Contudo, existem dissimilaridades entre espécies, possivelmente por variações na resiliência dos espermatozoides epididimários frente ao choque térmico (Martinez-Pastor et al., 2005c).

Alguns autores compararam os dois métodos de refrigeração de espermatozoides epididimários. Tamayo-Canul et al. (2011) colacionaram, em ovinos, a refrigeração do epidídimo inteiro antes da recuperação espermática (In-EPID) e a refrigeração de espermatozoides colhidos, diluídos e refrigerados a 5°C (Ex-EPID). Esses autores reportaram superioridade dos espermatozoides mantidos diluídos e refrigerados a 5°C nas primeiras 24 horas quando comparados aos espermatozoides mantidos nos epidídimos refrigerados. Entretanto, as amostras Ex-EPID apresentaram maior porcentagem de lesão de acrossoma quando comparadas aos espermatozoides mantidos no epidídimo pelo mesmo período de tempo. De forma similar, Fernández-Santos et al. (2009) relataram, em cervídeos, que a manutenção dos espermatozoides estocados dentro de epidídimos refrigerados retardou a perda da motilidade, porém, a viabilidade espermática foi menor 192 horas *post mortem* quando comparado aos espermatozoides recuperados e refrigerados *in vitro*. Provavelmente, o contato dos espermatozoides com os fluidos intersticiais do tecido epididimário em decomposição aumente a ação das espécies reativas do oxigênio (ROS) levando à depreciação da viabilidade espermática.

A diluição de espermatozóides oriundos de epidídimos em um meio tamponado reduz o efeito negativo do fluido intersticial e do sangue sobre os espermatozóides (Tamayo-Canul et al., 2011). Bertol et al. (2013) relataram que espermatozoides bovinos provenientes da cauda de epidídimo mantem-se viáveis pelo período de 36 horas após recuperação, diluição e refrigeração a 5°C. Abella et al. (2015) relatou superioridade do diluente “Bel 24” (170 mM glicose, 50 mM bicarbonato de potássio, 30 mM ácido glutâmico, 50 mM glicina, 10 mM prolina, 10 mM mio-isonitol, 20 mM D-manitol, 0.4% BSA e 20% de gema de ovo) quando comparado ao meio diluidor constituído de leite desnatado na manutenção de espermatozoides ovinos colhidos da cauda de epidídimo de carneiros. Os mesmos autores descreveram motilidade total de 18% no meio Bel 24 e 0% no meio com leite desnatado após 72 horas de refrigeração à 4°C.

Ainda que a refrigeração aumente o período de viabilidade espermática quando comparado à temperatura ambiente, este não é o método de escolha para a preservação definitiva dos espermatozoides.

### 3.2.2. Criopreservação de espermatozoides epididimários

Alguns autores relatam que o sêmen proveniente da cauda de epidídimo é mais resistente ao estresse térmico e osmótico quando comparado ao sêmen colhido em vagina artificial em equinos (Monteiro et al., 2013) e ovinos (Varisli et al., 2009).

Monteiro et al. (2013) relataram superioridade, após a criopreservação, dos espermatozoides colhidos da cauda de epidídimo de garanhões nos parâmetros cinéticos, integridade de membranas e status apoptótico quando comparado ao sêmen colhido em vagina artificial.

Álvarez et al. (2012) avaliaram a constituição dos meios diluidores para criopreservação de sêmen ovino colhido por eletro ejaculação, vagina artificial e espermatozoides recuperados da cauda de epidídimo. Esses autores identificaram que o diluidor composto por 20% de gema de ovo e concentração de 8% de glicerol é mais adequado para criopreservação de espermatozoides recuperados do epidídimo quando comparado a diluidores com 10% de gema de ovo e 4% de glicerol. Os mesmos autores sugeriram que, pela maior resiliência dos espermatozoides da cauda de epidídimo ao estresse osmótico, a concentração mais alta de glicerol possibilitou maior proteção durante a criopreservação sem que houvesse efeito tóxico deste componente às células.

As condições de temperatura e tempo de estocagem dos epidídimos no período entre a morte e a criopreservação alteram a qualidade espermática após a descongelação. Bertol et al. (2016) avaliaram o efeito da exposição de cauda de epidídimo bovinos à temperatura ambiente (18-20°C) na viabilidade e fertilidade dos espermatozoides após a criopreservação. Esses autores relataram diminuição da motilidade total e integridade de membrana plasmática pós-descongelação a partir de 30 horas de exposição à temperatura ambiente. Em contrapartida, quando os epidídimos bovinos são refrigerados antes da recuperação espermática, a viabilidade após a descongelação é mantida por até 72 horas após a morte (Martins et al. 2009).

Outros autores (Kaabi et al., 2003) estudaram o efeito da temperatura (temperatura ambiente e 5°C) e tempo de estocagem (0, 24 ou 48 h) de epidídimos ovinos na qualidade e fertilidade espermática após descongelação. Os mesmos autores relataram diminuição da motilidade total e progressiva após a descongelação

a partir de 24 horas quando os epidídimos foram mantidos à temperatura ambiente e a partir de 48 horas quando os epidídimos foram refrigerados a 5°C.

Em equinos, quando amostras epididimárias foram avaliadas após a descongelação, a motilidade progressiva é o parâmetro mais sensível ao tempo e à temperatura de estocagem dos epidídimos, diminuindo a partir de 6 horas quando os epidídimos foram mantidos à temperatura ambiente, e a partir de 18 horas quando foram mantidos refrigerados a 5°C (Monteiro et al., 2013).

### 3.3. Fertilidade de espermatozoides epididimários

A cauda de epidídimo é uma fonte de espermatozoides viáveis que são capazes de fertilizar oócitos (Lone et al., 2011). A fertilização de oócitos, *in vivo* ou *in vitro*, por espermatozoides colhidos da cauda de epidídimo já foi relatada em ratos (Songsasen et al., 1998; Kaneko et al., 2009), equinos (Monteiro et al., 2011), bovinos (Martins et al., 2009; Bertol et al., 2016), ovinos (Kaabi et al., 2003; Álvarez et al., 2012; Abella et al., 2015), suínos (Okazaki et al., 2012) e cervídeos (Garde et al., 1998).

Estudos relatam que a taxa de gestação após inseminação artificial por laparoscopia utilizando espermatozoides recuperados da cauda de epidídimo, em ovinos, é de aproximadamente 50% (Abella et al., 2015; Álvarez et al., 2012; Rickard et al., 2014). Entretanto, o período após a morte apresenta efeito negativo sobre a taxa de gestação. Segundo Abella et al. (2015), a perda na taxa de gestação por dia de estocagem corresponde a 7% em ovelhas Corridale e 12% em ovelhas Ile de France, quando os espermatozoides foram refrigerados.

Na fertilização *in vitro*, Kaabi et al. (2003) relataram diminuição ( $P < 0,05$ ) da taxa de clivagem de oócitos fertilizados por espermatozoides recuperados da cauda de epidídimo de ovinos 48 horas após a morte (38%<sup>b</sup>), quando comparada a amostras recém coletadas dos epidídimos (53%<sup>a</sup>) e ao sêmen colhido em vagina artificial (50%<sup>a</sup>). Entretanto, outros autores (García-Álvarez et al., 2009) descreveram superioridade na taxa de clivagem heteróloga do sêmen ovino colhido por eletroejaculação quando comparada aos espermatozoides coletados após a morte.

Blash et al. (2000) compararam a fertilidade de espermatozoides criopreservados, provenientes de epidídimos de bodes ou ejaculados coletados com vagina artificial na fertilização *in vitro* e inseminação artificial em tempo fixo. Na inseminação artificial houve diferença ( $P < 0,05$ ) significativa entre os grupos estudados sendo que, a taxa de gestação utilizando o sêmen coletado em vagina artificial foi de 39% enquanto com os espermatozoides oriundos da cauda de epidídimo foi de 5%. A taxa de clivagem e desenvolvimento até a fase de blastocisto não diferiu entre os grupos.

### 3.4. Plasma seminal

O plasma seminal é a secreção mista de várias glândulas do trato reprodutivo masculino (Domínguez et al., 2008). No momento da ejaculação, o plasma seminal é misturado aos espermatozoides (Moura et al., 2006). As proteínas, enzimas, lipídios, eletrólitos e vários outros fatores compõem o plasma seminal e desempenham papéis significativos na regulação metabólica dos espermatozoides (Marco-Jiménez et al., 2008). Os principais componentes do plasma seminal de ruminantes são as proteínas (Leahy e De Graaf, 2012). Estas proteínas têm sido associadas a vários aspectos relacionados à função espermática como a motilidade (Rodrigues et al., 2013), a formação do reservatório espermático no oviduto (Ardon e Suarez, 2013), a capacitação espermática (Mehr et al., 2015; Soleilhavoup et al., 2014), a resistência ou recuperação espermática frente às crioinjúrias (Domínguez et al., 2008; Okazaki et al., 2012), a função imunossupressora no trato reprodutivo feminino (Martínez-Pastor et al., 2006) e a capacidade dos espermatozoides sobreviverem e migrarem através da cérvix (Rickard et al., 2014). Por essas inúmeras funções, estudos vêm sendo realizados sobre a adição do plasma seminal em várias etapas do processamento espermático.

Mata-Campuzano et al. (2015) estudaram o efeito da adição de 0%, 20% e 40% de plasma seminal ao meio diluidor para refrigeração, sobre a viabilidade e motilidade do sêmen ovino refrigerado a 15°C por 24 horas. Os mesmos autores identificaram que plasma seminal em ambas as concentrações (20% e 40%) tiveram efeito positivo sobre a motilidade dos espermatozóides após 24 horas de armazenamento. Outros autores (López-Pérez e Pérez-Clariget, 2012) relataram que a adição de plasma seminal ao sêmen ovino, diluído em meio Tris-Gema e refrigerado a 5°C por 24 horas,

aumenta ( $P < 0,05$ ) a taxa de gestação (plasma seminal: 49,7%; controle: 31,1%) de ovelhas após inseminação cervical.

Domínguez et al. (2008) investigaram o efeito da adição de plasma seminal coletado nas quatro estações do ano (inverno, outono, verão e primavera), ao meio diluidor para criopreservação, sobre a qualidade *in vitro* do sêmen ovino descongelado. Os mesmos autores concluíram que o plasma seminal coletado no outono e inverno, quando adicionado ao meio diluidor antes da criopreservação, melhora a qualidade espermática após descongelação. Rickard et al. (2016) demonstraram que quando o plasma seminal de carneiros com alta resiliência a criopreservação é adicionado ao meio diluidor para congelamento, as amostras seminais apresentam maior motilidade após a descongelação.

Alguns constituintes do plasma seminal tem a capacidade de reverter as crioinjúrias após o processo de criopreservação (Domínguez et al., 2008; Ledesma et al., 2016). Por esse motivo pesquisadores estudam o efeito da diluição do sêmen em meios contendo plasma seminal após a descongelação. Aparentemente a ressuspensão do sêmen ovino descongelado em meios contendo plasma seminal melhora a motilidade e a integridade da membrana plasmática (El-Hajj Ghaoui et al., 2007; Bernardini et al., 2011; Ledesma et al., 2016) porém, estes benefícios não se refletem na melhora da fertilidade após a inseminação cervical ou intra-uterina (El-Hajj Ghaoui et al., 2007; O'Meara et al., 2007).

#### 3.4.1. Adição de plasma seminal a espermatozoides epididimários

Os espermatozoides colhidos da cauda de epidídimo não entram em contato com o plasma seminal. A ausência do plasma seminal nos espermatozoides colhidos da cauda de epidídimo pode alterar a qualidade espermática (Bertol et al. 2013). Estudos têm sido realizados com o objetivo de investigar o efeito do plasma seminal sobre os espermatozoides epididimários.

Graham (1994) relatou que a adição de plasma seminal ao meio diluidor para criopreservação de espermatozoides epididimários ovinos não interfere na motilidade após o período de estabilização a 5°C (plasma seminal: 78%; controle: 73%), porém, aumenta a motilidade após a descongelação (plasma seminal: 34%; controle: 3%).

Rickard et al. (2014) relataram que os espermatozoides ovinos, quando colhidos da cauda do epidídimo e expostos ao plasma seminal apresentam maior

capacidade de progredir através da cérvix e resultam em maiores índices de gestação após inseminação cervical. Porém, quando a inseminação é realizada diretamente no útero (laparoscopia) a taxa de gestação não varia.

Okazaki et al. (2012) incubaram, após a descongelação, espermatozoides suínos colhidos da cauda de epidídimo em meio diluente contendo plasma seminal. Estes autores relataram que a adição de plasma seminal à solução de descongelação diminuiu significativamente a porcentagem de espermatozoides com acrossoma lesado e aumentou a motilidade total de forma dose-dependente, além de aumentar significativamente a taxa de gestação e tamanho médio da leitegada.

Martínez-Pastor et al. (2006) relataram que a exposição ao plasma seminal de espermatozoides recuperados de epidídimos de cervídeos melhora a qualidade espermática após o período de estabilização (5°C por duas horas) e após a descongelação.

De forma contraditória, outros autores relataram que a exposição de espermatozoides recuperados do epidídimo ao plasma seminal é prejudicial à sobrevivência espermática em cães, ovinos, bovinos e búfalos (Dott et al., 1979; Herold et al., 2004). Mehr et al. (2015) comprovaram que a exposição de espermatozoides recuperados da cauda de epidídimo de ovinos às proteínas do plasma seminal promoveram o efluxo do colesterol da bicamada lipídica, resultando no enfraquecimento da célula e reduzindo a sua capacidade de suportar o estresse futuro.

Estes efeitos contraditórios da adição de plasma seminal aos espermatozoides recuperados da cauda de epidídimo são, provavelmente, resultado da grande variabilidade de componentes orgânicos e inorgânicos encontrados no plasma seminal (O'Meara et al., 2007). Os fatores que alteram a composição do plasma seminal e seu efeito sobre a célula espermática são: o método de coleta, sendo que o método que apresenta melhores resultados é a vagina artificial (Marco-Jiménez et al., 2008; Ledesma et al., 2016); a espécie, alguns estudos relatam que o plasma seminal é prejudicial ou indiferente no processamento do sêmen equino (Morrell et al., 2010; Mari et al., 2011); o efeito espécie específico, o efeito benéfico da adição do plasma seminal acontece principalmente quando o plasma seminal é recuperado da mesma espécie (Herold et al., 2004; Leahy e De Graaf, 2012; Martins et al., 2016), sendo que a adição de plasma seminal heterólogo é ineficaz; e o efeito individual (Rickard et al., 2016; Zalazar et al., 2016) entre outros. Em ovinos, parece haver um

consenso de que a estação do ano também influencia a composição do plasma seminal e o efeito sobre os espermatozoides é variável. Domínguez et al. (2008) identificaram ação benéfica do plasma seminal coletado no outono e inverno sobre o sêmen ovino. Leahy et al. (2010) confirmaram que, quando o plasma seminal de ovinos é coletado durante a estação reprodutiva, o efeito sobre o sêmen durante o processo de criopreservação é benéfico.

### 3.5. Análise de subpopulações espermáticas

A motilidade, a concentração e a morfologia espermática são características avaliadas classicamente nas amostras de sêmen (Arruda et al., 2011). A motilidade e a morfologia espermática podem ser aferidas de forma subjetiva ou objetiva. A análise objetiva da motilidade é realizada por meio de equipamentos automatizados (*Computer Assisted Sperm Analysis - CASA*) e softwares que avaliam a trajetória de cada espermatozoide presente na amostra. A análise objetiva da morfologia é realizada em equipamentos automatizados (*Computer Assisted Sperm Morphometry Analyses - CASMA*) que realizam fotografias de alta resolução e softwares específicos que avaliam ultraestruturas do citoesqueleto do espermatozoide (Bergstein et al., 2014).

O uso dos valores médios de motilidade simplificam demasiadamente a análise da motilidade e consideram a amostra como sendo homogênea (Martinez-Pastor et al., 2005b; Contri et al., 2012). Vários autores relatam que a amostra seminal é composta por populações heterogêneas de células espermáticas (Holt e Van Look, 2004; Rodríguez-Martínez, 2006; García-Álvarez et al., 2010; Bergstein et al., 2016). Segundo Rodríguez-Martínez (2006), a heterogeneidade espermática é baseada na motilidade e morfologia e tem reflexo na viabilidade e fertilidade das amostras. Com o objetivo de tornar a análise espermática *in vitro* mais representativa e estudar a heterogeneidade espermática, alguns pesquisadores analisaram de forma multivariada (análise de grupamentos) as amostras seminais e identificaram subpopulações de espermatozoides com características específicas, possibilitando o agrupamento destes espermatozoides em subpopulações espermáticas (Quintero-Moreno et al., 2003; Dorado et al., 2010; Bravo et al., 2011).

A identificação de subpopulações pode ser realizada com base em diversos parâmetros, sendo que os mais utilizados são a cinética espermática avaliada no CASA (Bravo et al., 2011; Dorado et al., 2011) e a morfometria avaliada no CASMA (Martí et al., 2011; Santolaria et al., 2015). Os parâmetros cinéticos utilizados na análise multivariada para identificação de subpopulações são: velocidade de trajeto (VAP,  $\mu\text{m/s}$ ), velocidade progressiva (VSL,  $\text{m/s}$ ), velocidade curvilínea (VCL,  $\mu\text{m/s}$ ), amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH,  $\mu\text{m}$ ), frequência de batimentos do flagelo (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %) e linearidade (LIN, %). A análise de subpopulações por morfometria utiliza os seguintes parâmetros: área (A,  $\mu\text{m}^2$ ), perímetro (P,  $\mu\text{m}$ ), comprimento da cabeça (C,  $\mu\text{m}$ ), largura (L,  $\mu\text{m}$ ), elipsidade (C/L), rugosidade ( $4xA/P^2$ ), alongamento (C-L/C+L) e regularidade (CxL/4xA).

Bravo et al. (2011) realizaram o primeiro estudo de subpopulações, baseado na cinética espermática, no ejaculado de ovinos. Estes autores identificaram cinco subpopulações espermáticas sendo que a maior subpopulação foi formada por espermatozoides rápidos e progressivos.

Yániz et al. (2015) investigaram as subpopulações espermáticas baseadas na morfometria da cabeça dos espermatozoides e na cinética espermática em carneiros com alta e baixa fertilidade. Foram identificadas três subpopulações morfométricas e três subpopulações cinéticas. As subpopulações morfométricas foram classificadas em Subpopulação 1 (SP1m): espermatozoides pequenos; Subpopulação 2 (SP2m): espermatozoides redondos e com tamanho médio; Subpopulação 3 (SP3m): espermatozoides grandes e longos. As subpopulações cinéticas foram classificadas em Subpopulação 1 (SP1c): lentos e não lineares; Subpopulação 2 (SP2c): rápidos e lineares; Subpopulação 3 (SP3c): rápidos e não lineares. Os carneiros com alta fertilidade apresentaram maiores proporções das subpopulações SP2c e SP3m.

Alguns autores estudaram a correlação entre as subpopulações espermáticas e a fertilidade. Ferraz et al. (2014) relataram, em bovinos, correlação significativa de 0,63 entre a porcentagem da subpopulação caracterizada por espermatozoides rápidos e progressivos com a taxa de formação de pronúcleo na FIV. García-Álvarez et al. (2013) relataram correlação positiva e significativa entre a subpopulação de espermatozoides hiperativados e a taxa de clivagem na FIV de ovinos. Maroto-Morales et al. (2015) encontraram forte correlação ( $P < 0,01$ ) entre a subpopulação formada por espermatozoides com cabeças curtas e alongadas e fertilidade de

carneiros após monta natural. Entretanto, Santolaria et al. (2015) não encontraram relação entre as subpopulações espermáticas cinéticas e morfométricas de carneiros e a taxa de gestação após AI cervical.

Outros autores avaliaram a variação das porcentagens das subpopulações espermáticas durante o processo de criopreservação. Martínez-Pastor et al. (2005b) encontraram correlação positiva entre a porcentagem da subpopulação de espermatozoides lineares antes do congelamento e a viabilidade após descongelação no sêmen de cervídeos. Da mesma forma, Muiño et al. (2008) identificaram, em touros, que os ejaculados que continham maior porcentagem da subpopulação caracterizada por espermatozoides rápidos e progressivos apresentavam maior resistência à criopreservação e demonstraram maior longevidade após descongelação.

A porcentagem das subpopulações dos espermatozoides recuperados de epidídimos sofre influência do tempo entre a morte e a criopreservação. Martínez-Pastor et al. (2005b) relataram, em cervídeos, decréscimo significativo da porcentagem de subpopulações ligadas à boa qualidade espermática quanto maior o período *post mortem*, sendo que essas subpopulações desapareceram 72 horas após a morte. No que se refere ao sêmen de ovinos, não foram encontrados estudos sobre subpopulações espermáticas nos espermatozoides epididimários. Assim sendo, o Artigo III desta tese é o primeiro relato de subpopulações espermáticas cinéticas em espermatozoides ovinos epididimários e do efeito do período *post mortem* sobre as subpopulações identificadas.

Segundo Bravo et al. (2011), as implicações práticas do estudo de subpopulações são claras: para a melhoria da qualidade das análises espermáticas do ejaculado ovino, ou de seus processos, estudos de subpopulações devem substituir a abordagem estatística de avaliação dos valores cinéticos médios.

## ARTIGO I

### VIABILIDADE DOS ESPERMATOZOIDES COLHIDOS DE EPIDÍDIMOS DE OVINOS E ARMAZENADOS A 18°C-25°C POR 48 HORAS *POST MORTEM*

*Viability of ovine sperm collected from epididymides stored at 18°-25°C for 48 hours post mortem*

#### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi verificar o período máximo de tempo no qual é possível recuperar espermatozoides ovinos viáveis de epidídimos mantidos à temperatura ambiente (18-25°C) e o efeito de dois meios diluidores, com ou sem plasma seminal, sobre o sêmen refrigerado a 5°C foi investigado. Sêmen em vagina artificial (AV) e espermatozoides epididimários 0 (G0), 6 (G6), 12 (G12), 24 (G24) e 48 (G48) horas após a morte foram analisados. Foi avaliada a motilidade total (TM), motilidade progressiva (PM), integridade de membrana pelo teste hiposmótico (HOST) e morfologia espermática. A recuperação espermática foi menor ( $P < 0,05$ ) 48 horas após a morte. A TM diminuiu ( $P < 0,05$ ) a partir de 24 horas *post mortem*. A porcentagem de espermatozoides viáveis no HOST diminuiu ( $P < 0,05$ ) no G48 quando comparado aos outros grupos. A recuperação de espermatozoides viáveis de epidídimos mantidos à temperatura ambiente foi possível até 48 horas após a morte, contudo a qualidade espermática decaiu 24 horas após a morte. Foi possível manter a viabilidade espermática por até 48 horas, quando as amostras foram refrigeradas a 5°C nos grupos em que a coleta dos espermatozoides da cauda dos epidídimos foi realizada até 24 horas após a morte, porém, a TM diminuiu ( $P < 0,05$ ) a partir de 24 horas de refrigeração. A adição de 20% de plasma seminal ao meio diluidor utilizado na refrigeração não apresentou efeito sobre os parâmetros estudados.

Palavras-chave: carneiro, epidídimos, refrigeração, temperatura ambiente

## 1. Introdução

O epitélio dos túbulos epididimários possui atividades secretórias e absortivas que promovem alterações na célula espermática, culminando em sua maturação durante o trânsito da célula espermática através do órgão (Vernet et al. 2004). A recuperação de espermatozoides viáveis da cauda de epidídimo foi relatada em touros (Ardon e Suarez, 2013; Bertol et al. 2013), garanhões (Weiss et al. 2008; Monteiro et al. 2013), cães (Hishinuma e Sekine, 2004; Filho et al., 2013) e carneiros (Kaabi et al. 2003; Vásquez et al. 2013). O aproveitamento do material genético obtido dos epidídimos é principalmente interessante quando acontece a morte repentina de reprodutores de interesse zootécnico ou na preservação de espécies ameaçadas. Contudo poucos trabalhos relatam a manutenção dos epidídimos em temperatura ambiental após a morte, condição em que os animais são comumente encontrados.

O processo de criopreservação do sêmen causa injúrias às células espermáticas que pode resultar na diminuição da fertilidade (Celeghini et al. 2008). A maior vantagem do processo de refrigeração espermática em fase líquida é que este método evita danos associados a criopreservação e resulta em maior viabilidade do sêmen (Crespilho et al. 2014). Em ovinos, é possível utilizar sêmen refrigerado a 5°C para a inseminação artificial até três dias após a coleta, porém, a fertilidade cai após 24 horas da coleta (O'Hara et al., 2010).

O plasma seminal adicionado ao meio diluidor parece exercer função de proteção aos espermatozoides ovinos, conservando a motilidade total quando o sêmen é refrigerado (Mata-Campuzano et al., 2015) ou congelado (Domínguez et al., 2008), além de aumentar a taxa de gestação em ovelhas inseminadas (López-Pérez e Pérez-Clariget, 2012). A ausência do plasma seminal nos espermatozoides colhidos da cauda de epidídimo pode alterar a qualidade espermática, em especial a TM (Bertol et al. 2013). Contudo o efeito da adição do plasma seminal a espermatozoides epididimários é contraditória, alguns autores (Graham, 1994) reportaram efeito positivo na motilidade durante a refrigeração e criopreservação, em contraste, outros autores (Dott et al. 1979) relataram que, ainda que o plasma seminal inicialmente estimule a

motilidade, sua adição foi prejudicial à sobrevivência espermática após 15 minutos de exposição.

Os objetivos deste trabalho foram avaliar o tempo de viabilidade de espermatozoides ovinos mantidos em epidídimos armazenados em temperatura ambiente (18-25°C), utilizando o sêmen coletado em vagina artificial como controle, e avaliar a resistência espermática frente a refrigeração a 5°C em meio controle (CM) ou CM acrescido de 20% de plasma seminal (SP).

## 2. Material e métodos

### 2.1. Projeto experimental

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Campus de Ciência Agrárias da Universidade Federal do Paraná, protocolo número 052/2016.

Foram utilizados 10 carneiros sem raça definida com idade entre 12 e 24 meses. Os animais permaneceram em sistema intensivo, com acesso à pastagem de campo nativo durante o dia e confinados no período da noite. Recebiam suplementação alimentar com milho, farelo de soja e mistura de minerais. O fornecimento de água foi *ad libitum*.

Com o uso de uma ovelha como manequim, a coleta do sêmen foi realizada pelo método de vagina artificial (AV). A temperatura interna final da AV foi de 40°C a 43°C. As coletas em AV foram realizadas duas vezes por semana, durante o período de dois meses, fora da estação reprodutiva (janeiro e fevereiro), e, posteriormente, esses animais foram encaminhados para o abate. Após o abate, um corte transversal foi realizado na região do funículo espermático para excisão do escroto contendo testículos e epidídimos. As peças anatômicas foram transportadas ao laboratório, em no máximo uma hora, em caixa de isopor à temperatura ambiente (18-25°C).

Os epidídimos foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos, correspondentes ao período de exposição das peças anatômicas à temperatura ambiente: zero horas (G0), seis horas (G6), doze horas (G12), vinte e quatro horas

(G24) e quarenta e oito horas (G48). Cada grupo foi constituído de quatro epidídimos, provenientes de quatro carneiros distintos.

Após coleta em AV ou da cauda dos epidídimos, as amostras espermáticas foram analisadas. Em seguida, as amostras espermáticas foram diluídas para a refrigeração. Uma alíquota do sêmen foi diluída em 500µL de CM ou no CM acrescido de 20% de plasma seminal (SP) na concentração de  $400 \times 10^6$  espermatozoides por mL. As amostras diluídas foram refrigeradas a 5°C em geladeira seguindo o método descrito por Rodello (2006). Decorridas 0 horas (R0), 6 horas (R6), 12 horas (R12), 24 horas (R24), 48 horas (R48) e 72 horas (R72) a partir do início da refrigeração, uma alíquota de 50µL da suspensão foi recolhida para análise de TM, PM, HOST e morfologia espermática.

## 2.2. Meios diluidores

O CM utilizado na refrigeração foi constituído de 75mL de solução mãe (200mL água destilada, 1,4g glicina, 2,97g citrato de sódio, 3g frutose, 0,004g amicacina), 15mL de leite desnatado à 11%, 5g gema de ovo e 4,6 mL de água destilada (Rodello et al., 2011). No CM foi adicionado 20% de plasma seminal para constituir o meio SP. O plasma seminal foi proveniente dos mesmos carneiros utilizados na coleta de sêmen com vagina artificial. A obtenção do plasma seminal e produção do meio diluidor com plasma seminal seguiu a metodologia de López-Pérez e Pérez-Clariget (2012).

## 2.3. Coleta dos espermatozoides da cauda de epidídimo

No laboratório, com lâmina de bisturi, foi realizada a incisão na pele do escroto para excisão dos testículos e epidídimos (Vásquez et al., 2013). Os testículos e epidídimos foram lavados com solução de cloreto de sódio a 0,09% aquecido a 35°C, em seguida, a secção da região de junção entre corpo e cauda dos epidídimos foi realizada. As caudas dos epidídimos foram alocadas em placas de Petri pré-aquecidas e mantidas a 35°C. Utilizando pinça anatômica, tesouras e lâmina de

bisturi, os vasos sanguíneos superficiais e aparentes foram dissecados e perfurados para evitar a contaminação dos espermatozoides com sangue. Na sequência, foram realizados cortes transversais e leve pressão sobre a cauda de epidídimo para que os espermatozoides contidos nos túbulos fossem removidos (Kaabi et al. 2003) em 2mL do CM aquecido a 35°C. Após cinco minutos, os espermatozoides diluídos foram pipetados da placa de Petri em tubo cônico (BD Falcon) (Martinez-Pastor et al. 2006b).

#### 2.4. Avaliação espermática

A aferição do volume do ejaculado coletado com vagina artificial foi mensurado utilizando um copo coletor de vidro graduado. O volume do sêmen coletado da cauda de epidídimo foi mensurado em tubo de fundo cônico (BD Falcon).

As TM e PM foram avaliadas de forma subjetiva em microscopia óptica (Coleman, N 107, Brasil). Uma gota do sêmen diluído foi depositada entre lâmina e lamínula e examinada em microscopia óptica em aumento de 400x. Todas as amostras foram analisadas pela mesma pessoa.

A concentração espermática foi determinada pela contagem de células em câmara de Neubauer. A diluição usada para o sêmen fresco foi de 1:400 e, nos espermatozoides coletados dos epidídimos, de 1:200.

Para a realização do teste hiposmótico (HOST), uma amostra de 10µL de sêmen foi depositada em 50µL de água aquecida a 37°C (Hishinuma e Sekine, 2004). Após 60 minutos de incubação em banho-maria a 37°C, uma alíquota de 10µL dessa suspensão foi depositada entre lâmina e lamínula e avaliada em microscópio óptico em aumento de 400x. Foram avaliadas 200 células por amostra, sendo que os espermatozoides que apresentavam cauda dobrada foram classificados como íntegros por possuírem membrana plasmática funcional (Vásquez et al., 2013).

A morfologia espermática foi realizada pela contagem diferencial de 200 células em lâmina preparada com esfregaço do sêmen diluído e corada pelo método de Cerovsky (1976).

## 2.5. Estatística

Médias e desvio padrão dos grupos (horas após a morte) e dos meios diluidores foram analisados usando o teste Two-way ANOVA. O teste ANOVA, de medidas repetidas, foi usado para analisar diferenças entre os momentos de refrigeração. Interações entre o momento de refrigeração, grupo e meio diluidor também foram avaliados. O teste de Tukey para comparações múltiplas foi aplicado quando o valor de P foi menor que 0,05.

## 3. Resultados

### 3.1. Recuperação espermática

As médias  $\pm$  desvio padrão da concentração ( $\times 10^6$  espermatozoides/mL), volume (mL) e concentração total (CONC TOTAL  $\times 10^6$ ) do sêmen coletado em vagina artificial e espermatozoides colhidos de epidídimos 0, 6, 12, 24 e 48 horas após a morte estão descritos na tabela 1. A concentração, volume e CONC TOTAL diminuiu ( $P < 0.05$ ) 48 horas após a morte. O volume e CONC TOTAL foram maiores nos grupos G0, G6, G12 e G24, quando comparados à coleta em vagina artificial.

TABELA 1. MÉDIAS  $\pm$  DESVIO PADRÃO DA CONCENTRAÇÃO ( $\times 10^6$  ESPERMATOZOIDEOS/ML), VOLUME (ML) E CONCENTRAÇÃO TOTAL (CONC TOTAL  $\times 10^6$ ) NO SÊMEN COLETADO EM VAGINA ARTIFICIAL, E ESPERMATOZOIDEOS COLHIDOS DE EPIDÍDIMOS 0, 6, 12, 24 E 48 HORAS APÓS A MORTE.

Grupo	Concentração (espermatozoides/mL $\times 10^6$ )	Volume (mL)	CONC TOTAL ( $\times 10^6$ )
AV	2571,8 $\pm$ 730,27 <sup>a</sup>	1,1 $\pm$ 0,19 <sup>b</sup>	2623,6 $\pm$ 1063,42 <sup>b</sup>
G0	2298,4 $\pm$ 813,43 <sup>ab</sup>	3,1 $\pm$ 0,65 <sup>a</sup>	6936,6 $\pm$ 1551,39 <sup>a</sup>
G6	1763,8 $\pm$ 1071,79 <sup>ab</sup>	2,6 $\pm$ 0,33 <sup>a</sup>	4336,5 $\pm$ 2419,76 <sup>ab</sup>
G12	2137,5 $\pm$ 323,74 <sup>ab</sup>	3,0 $\pm$ 0,41 <sup>a</sup>	6349,3 $\pm$ 1009,17 <sup>a</sup>
G24	1437,5 $\pm$ 698,7 <sup>ab</sup>	2,8 $\pm$ 0,54 <sup>a</sup>	4239,8 $\pm$ 2491,18 <sup>ab</sup>
G48	1036,0 $\pm$ 650,47 <sup>b</sup>	1,9 $\pm$ 0,55 <sup>b</sup>	2064,2 $\pm$ 1379,33 <sup>b</sup>

Letras diferentes na mesma coluna são estatisticamente diferentes ( $P < 0,05$ )

### 3.2. Viabilidade espermática *post mortem*

A motilidade total do sêmen colhido da cauda dos epidídimos diminuiu ( $P < 0.05$ ) a partir de 24 horas após a morte. A PM diminuiu ( $P < 0,05$ ) a partir de 12 horas após a morte. A porcentagem de espermatozoides íntegros no HOST somente foi diferente ( $P < 0.05$ ) no G48 quando comparado ao sêmen colhido em vagina artificial e não diferiu do G6, G12 e G24. Não houve diferença na porcentagem de células com defeitos de acrossoma ( $P > 0.05$ ) em todos os grupos avaliados, porém, o G24 apresentou maior ( $P < 0.05$ ) concentração de defeitos de cauda quando comparados aos outros grupos. Os resultados detalhados da TM, PM, HOST e morfologia espermática estão descritos na Tabela 2.

TABELA 2. MÉDIA  $\pm$  DESVIO PADRÃO DA MOTILIDADE TOTAL (TM %), MOTILIDADE PROGRESSIVA (PM %), INTEGRIDADE DE MEMBRANA PLASMÁTICA (HOST %ÍNTEGROS), DEFEITOS DE ACROSSOMA (%) E DEFEITOS DE CAUDA (%) NO SÊMEN COLETADO COM VAGINA ARTIFICIAL (AV) E COLHIDOS DE EPIDÍDIMOS 0, 6, 12, 24 E 48 HORAS APÓS A MORTE.

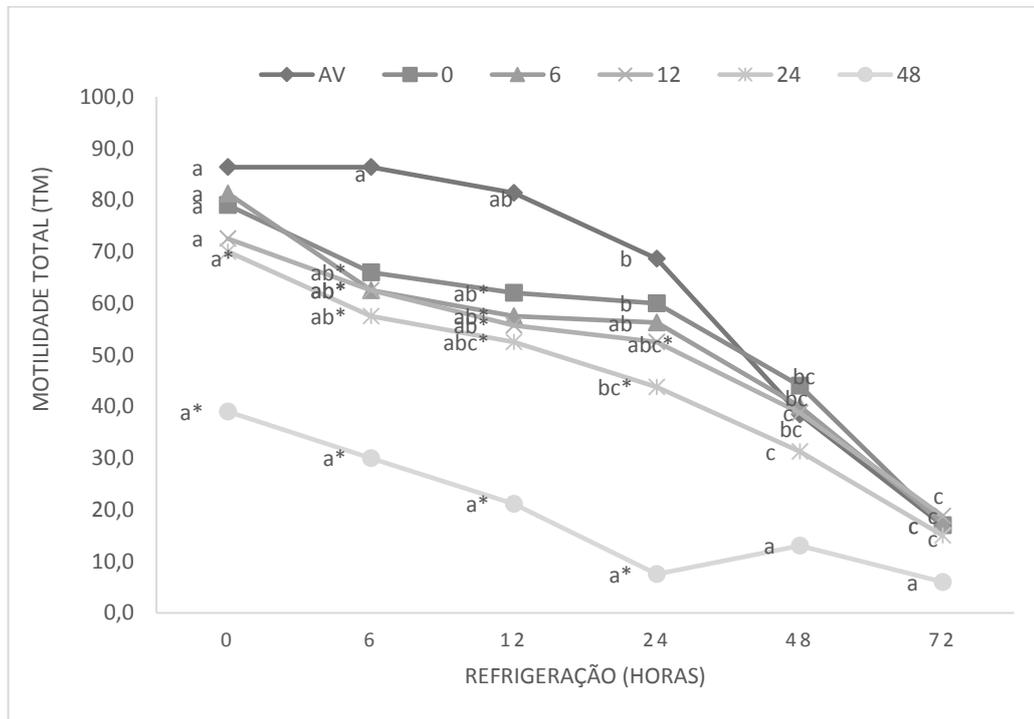
Grupo	TM (%)	PM (%)	HOST (% íntegros)	Defeitos de acrossoma (%)	Defeitos de cauda (%)
AV	86,4 $\pm$ 4,9 <sup>a</sup>	73,2 $\pm$ 6,5 <sup>a</sup>	90,4 $\pm$ 6,1 <sup>a</sup>	2,0 $\pm$ 2,4 <sup>a</sup>	13,8 $\pm$ 8,4 <sup>b</sup>
G0	79,0 $\pm$ 13,7 <sup>ab</sup>	62,0 $\pm$ 14,0 <sup>a</sup>	82,0 $\pm$ 2,1 <sup>a</sup>	1,0 $\pm$ 1,4 <sup>a</sup>	10,0 $\pm$ 5,2 <sup>b</sup>
G6	81,3 $\pm$ 11,3 <sup>ab</sup>	65,0 $\pm$ 9,3 <sup>a</sup>	77,1 $\pm$ 5,7 <sup>ab</sup>	1,8 $\pm$ 1,6 <sup>a</sup>	16,6 $\pm$ 6,2 <sup>ab</sup>
G12	72,5 $\pm$ 4,6 <sup>ab</sup>	31,3 $\pm$ 11,3 <sup>b</sup>	79,1 $\pm$ 4,6 <sup>ab</sup>	2,0 $\pm$ 3,4 <sup>a</sup>	23,5 $\pm$ 16,7 <sup>ab</sup>
G24	70,0 $\pm$ 5,4 <sup>b</sup>	26,3 $\pm$ 9,2 <sup>bc</sup>	77,4 $\pm$ 3,4 <sup>ab</sup>	4,0 $\pm$ 4,0 <sup>a</sup>	34,4 $\pm$ 20,9 <sup>a</sup>
G48	39,0 $\pm$ 24,2 <sup>c</sup>	14,0 $\pm$ 12,7 <sup>c</sup>	60,0 $\pm$ 25,4 <sup>b</sup>	4,1 $\pm$ 4,1 <sup>a</sup>	27,6 $\pm$ 21,9 <sup>ab</sup>

Letras diferentes na mesma coluna são estatisticamente diferentes ( $P < 0,05$ )

### 3.3. Refrigeração espermática

A Figura 1 demonstra a TM após 0, 6, 12, 24, 48 e 72 horas de refrigeração das amostras a 5°C. A TM diminuiu a partir das 24 horas de refrigeração nos grupos AV, G0 e G24, e a partir das 48 horas de refrigeração nos grupos G6 e G12. No G48 a TM diminuiu gradativamente, porém, sem diferença estatística ( $P > 0,05$ ) entre os momentos de refrigeração. Desde o momento inicial até 24 horas de refrigeração, a TM do G24 e G48 foi inferior ( $P < 0,05$ ) quando comparada a todos os outros grupos.

FIGURA 1. GRÁFICO DA MOTILIDADE TOTAL NO SÊMEN COLETADO EM VAGINA ARTIFICIAL (AV) E ESPERMATOZOÍDES COLETADOS DE EPIDÍDIMOS 0, 6, 12, 24 E 48 HORAS APÓS A MORTE E REFRIGERADO A 5°C POR 0, 6, 12, 24, 48 E 72 HORAS.



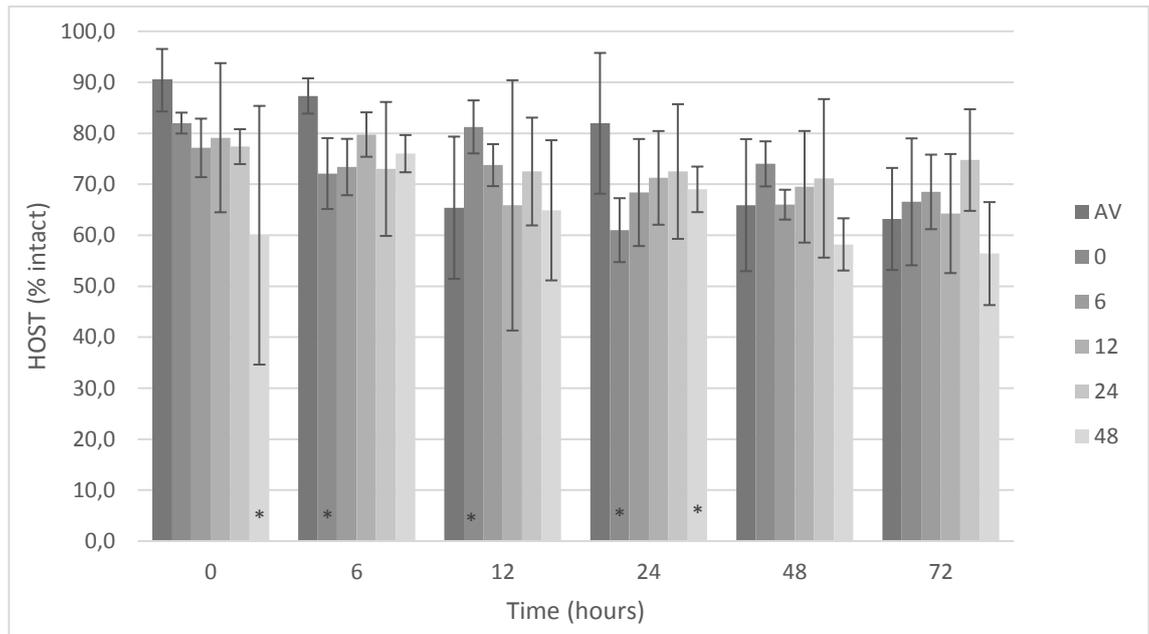
Letras diferentes (a,b,c) são diferentes ( $P < 0.05$ ) dentro do mesmo grupo.

\*Difere ( $P < 0.05$ ) do grupo AV dentro do mesmo momento de refrigeração.

A porcentagem de espermatozoides íntegros no HOST foi menor ( $P < 0,05$ ) no G0 momento 6 horas e no G48 nos momentos 0 e 24 horas após refrigeração, quando

comparado ao grupo AV (Figura 2). Não houve diferença significativa na morfologia espermática entre os grupos em nenhum dos momentos.

FIGURA 2. GRÁFICO DAS MÉDIAS E DESVIO PADRÃO DO HOST (% ÍNTEGROS) NO SÊMEN COLETADO EM VAGINA ARTIFICIAL (AV) E ESPERMATOZOÍDAS COLHIDOS DE EPIDÍDIMOS 0, 6, 12, 24 E 48 HORAS APÓS A MORTE E REFRIGERADO A 5°C POR 0, 6, 12, 24, 48 E 72 HORAS.



\*Difere ( $P < 0,05$ ) do grupo AV dentro do mesmo momento de refrigeração.

### 3.4. Meios diluidores

A TM (média  $\pm$  desvio padrão) das amostras diluídas em CM e SP e refrigeradas a 5°C pelo período de 0 horas (CM:  $73,3 \pm 20,1$ ; SP:  $74,2 \pm 19,5$ ), 6 horas (CM:  $63,9 \pm 22,5$ , SP:  $66,97 \pm 66,97$ ), 12 horas (CM:  $56,4 \pm 26,4$ , SP:  $59,4 \pm 23,3$ ), 24 horas ( $59,9 \pm 29,9$ , SP:  $51,2 \pm 28,8$ ), 48 horas (CM:  $35,7 \pm 22,1$ , SP:  $33,9 \pm 20,0$ ) e 72 horas (CM:  $14,5 \pm 12,2$ , SP:  $14,5 \pm 13,0$ ) não foi estatisticamente diferente ( $P=0.0629$ ). Tampouco

o HOST (%íntegros)( $P=0,689$ ), defeitos de acrossoma ( $P=0,666$ ) e defeitos de cauda ( $P=0,471$ ) foram diferentes entre os meios diluidores CM e SP.

#### 4. Discussão

A recuperação de espermatozoides viáveis após a morte já foi descrita em diversas espécies (Kaabi et al., 2003; Tittarelli et al., 2006; Weiss et al., 2008), entretanto poucos estudos avaliaram o tempo de viabilidade dos espermatozoides quando os epidídimos foram expostos à temperatura ambiente.

A TM é o parâmetro espermático que mais sofre interferência do tempo após a morte (Martinez-Pastor et al., 2005c). No presente trabalho, a TM das amostras coletadas em vagina artificial foi de  $86,4 \pm 4,9\%$  e diferiu ( $P<0,05$ ) dos grupos em que as amostras foram coletadas 24 horas após a morte ( $G_{24} = 70,0 \pm 5,4\%$ ,  $G_{48} = 39,0 \pm 24,2\%$ ). Os espermatozoides íntegros no HOST(%íntegros) diminuíram ( $P<0,05$ ) 48 horas após a morte (Tab.2). A morfologia espermática não apresentou diferença entre os grupos estudados (Tab.2). Os achados do nosso trabalho corroboram os encontrados por Kaabi et al. (2003) que verificaram, em carneiros, a diminuição ( $P<0,05$ ) na TM a partir de 24 horas *post mortem* e da porcentagem de células íntegras no teste hiposmótico a partir de 48 horas após a morte do animal, quando os epidídimos são mantidos à temperatura ambiente ( $22^{\circ}\text{C}$ ). Alguns estudos relataram que a TM e viabilidade dos espermatozoides diminuem a partir de 48 horas após a morte dos animais (cervídeos: Martinez-Pastor et al., 2005c; ovinos: Tamayo-Canul et al., 2011; bovinos: Martins et al. 2009), contudo estes autores avaliaram epidídimos que foram refrigerados entre 4 e  $5^{\circ}\text{C}$ , demonstrando que a estocagem dos epidídimos a menores temperaturas prolonga a sobrevivência espermática. Porém, normalmente, animais zootecnicamente importantes ou animais de espécies ameaçadas de extinção são encontrados mortos após terem sido expostos à temperatura ambiente por algum período de tempo. Por essa razão o efeito da exposição à temperatura ambiente ( $18-25^{\circ}\text{C}$ ) na viabilidade de espermatozoides epididimários ovinos foi estudado. É possível recuperar espermatozoides de carneiros com motilidade e viabilidade até 48 horas após a morte, porém, a partir de 24 horas existe um decréscimo significativo da motilidade espermática.

Em nossos trabalhos preliminares, foram identificadas limitações ao tentar realizar o método de lavagem retrógrada na cauda de epidídimos ovinos. O calibre dos túbulos epididimários era muito pequeno e a dissecação do tecido conjuntivo que os envolve, por vezes, provocava a ruptura dos túbulos impedindo a lavagem completa do órgão. A média de espermatozoides recuperados neste trabalho foi similar à relatada por outros autores que utilizaram o mesmo método de coleta de espermatozoides a partir da cauda de epidídimos de carneiros (Kaabi et al., 2003; Lone et al., 2011). A recuperação espermática diminuiu ( $P < 0.05$ ) a partir de 48 horas após a morte, corroborando estudos realizados em ovinos (Lone et al., 2011), equinos (Neild et al., 2006) e cervídeos (Martinez-Pastor et al., 2005c). A diminuição da TM e viabilidade espermática durante a estocagem dos epidídimos pode ser responsável pela diminuição da taxa de recuperação por filtração, visto que a técnica é baseada na migração das células espermáticas do tubo epididimário até o meio diluidor.

A diluição dos espermatozoides colhidos da cauda de epidídimos em um meio diluidor tamponado evita a ação negativa do sangue ou fluido intersticial sobre as células espermáticas (Tamayo-Canul et al., 2011). Durante a refrigeração todos os grupos de amostras epididimárias tiveram menores ( $P < 0,05$ ) valores de TM quando comparados ao grupo AV entre o tempo 6 e 24 de refrigeração (Figura 1). A porcentagem de íntegros no HOST foi menor ( $P < 0,05$ ) no G0 às 6 horas e 48 horas de refrigeração e no G48 às 0 horas e 24 horas de refrigeração quando comparadas ao grupo AV. É possível que a ausência de debris celulares no ejaculado tenha resultado em melhores condições de preservação destas amostras em fase líquida, ainda que esta diferença não tenha persistido a partir de 24 horas de armazenamento.

A diminuição da temperatura no armazenamento do sêmen diminui o metabolismo dos espermatozoides e aumenta sua sobrevivência e fertilidade (Kaneko et al., 2009), porém, o tempo de estocagem tem efeito negativo sobre a motilidade e viabilidade espermática (Salamon e Maxwell, 2000; Sariözkan et al., 2014). O período pelo qual o sêmen pode ser refrigerado sem sofrer alterações em sua qualidade, varia conforme a constituição do meio diluidor (Kasimanickam et al., 2011), curva de refrigeração (Salamon e Maxwell, 2000) ou concentração espermática das amostras (Mata-Campuzano et al., 2015). Neste estudo, a refrigeração das amostras permitiu a manutenção da TM ( $P > 0,05$ ) por 24 horas nos grupos G6 e G12, e pelo período de 12 horas nos grupos G0 e G24. O G48 apresentou baixa TM em todos os momentos

avaliados, e aparentemente os espermatozoides ovinos não são adequados para a refrigeração quando são colhidos 48 horas após a morte. A porcentagem de íntegros no HOST e a morfologia espermática não diferiram ( $P>0,05$ ) entre os tempos de refrigeração (Figura 2). Houve redução da motilidade das amostras refrigeradas a partir de 24 horas após o início da refrigeração, porém, os grupos AV, G0, G6, G12 e G24 mantiveram TM satisfatório (maior de 30%) até 48 horas de refrigeração.

A adição de plasma seminal não teve efeito sobre nenhum parâmetro em nenhum grupo ou momento durante a refrigeração a 5°C. Os resultados do presente trabalho diferiram de outros autores que realizaram a adição de plasma seminal em meio diluidor para refrigeração espermática (Álvarez et al., 2012; López-Pérez e Pérez-Clariget, 2012; Mata-Campuzano et al., 2014). Muitos fatores podem influenciar o efeito do plasma seminal sobre espermatozoides (Leahy e De Graaf, 2012). Segundo Leahy et al. (2010), a eficiência do plasma seminal na manutenção da qualidade espermática é alterada de acordo com a estação do ano em que o plasma seminal é coletado dos carneiros. A adição de plasma seminal coletado no verão não têm efeito sobre a qualidade espermática (Domínguez et al. 2008), porém é possível que este fator possa ter influenciado os resultados, sendo necessária a repetição deste estudo utilizando plasma seminal coletado em estação reprodutiva.

#### 4.1. Conclusões

(1) Foi possível recuperar espermatozoides ovinos, com motilidade e viabilidade, até 48 horas *post mortem*, da cauda de epidídimo mantido em temperatura ambiente; (2) A partir de 24 horas *post mortem* ocorreu um decréscimo da motilidade espermática (3) A partir de 48 horas pós-morte ocorreu a redução na concentração e no número total de células espermáticas recuperadas; (4) A diluição dos espermatozoides e refrigeração a 5°C têm efeito positivo sobre a preservação da motilidade dos espermatozoides até 48h pós-recuperação; (5) Adição de plasma seminal no meio diluidor não teve efeito sobre a viabilidade espermática.

## Agradecimentos

T.G. Bergstein-Galan recebeu bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES (Brasil).

## REFERÊNCIAS

- ÁLVAREZ, M.; TAMAYO-CANUL, J.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, C.; et al. Specificity of the extender used for freezing ram sperm depends of the spermatozoa source (ejaculate, electroejaculate or epididymis). **Animal reproduction science**, v. 132, n. 3–4, p. 145–154, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432012001339>>. Acesso em: 1/2/2016.
- ARDON, F.; SUAREZ, S. S. Cryopreservation increases coating of bull sperm by seminal plasma binder of sperm proteins BSP1, BSP3, and BSP5. **Reproduction**, v. 146, n. 2, p. 111–117, 2013.
- BERTOL, M. A. F.; WEISS, R. R.; TOMAZ - SOCCOL, V.; et al. Viability of bull spermatozoa collected from the epididymis stored at 18-20 ° C. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, n. 5, p. 777–783, 2013.
- CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; et al. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. **Animal reproduction science**, v. 104, n. 2–4, p. 119–131, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432007000413>>. Acesso em: 5/5/2016.
- CEROVSKY, J. A. A new staining procedure for boar spermatozoa. **Zivocisna Vyroba**, v. 21, p. 351–362, 1976.
- CRESPILHO, A. M.; NICHI, M.; GUASTI, P. N.; et al. Sperm fertility and viability following 48h of refrigeration: evaluation of different extenders for the preservation of bull semen in liquid state. **Animal reproduction science**, v. 146, n. 3–4, p. 126–133, 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432014000694>>. Acesso em: 1/2/2016.
- DOMÍNGUEZ, M. P.; FALCINELLI, A.; HOZBOR, F.; et al. Seasonal variations in the composition of ram seminal plasma and its effect on frozen-thawed ram sperm. **Theriogenology**, v. 69, n. 5, p. 564–573, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X07006498>>. Acesso em: 15/2/2016.
- DOTT, H. M.; HARRISON, R. A.; FOSTER, G. C. The maintenance of motility and the surface properties of epididymal spermatozoa from bull, rabbit and ram in homologous seminal and epididymal plasma. **Journal of reproduction and fertility**, v. 55, p. 113–124, 1979.
- FILHO, A. C. M.; SILVA, H. V. R.; FREITAS, L. A.; et al. Refrigeração do epidídimo canino a 4°C e recuperação dos espermatozoides epididimários utilizando ACP-

106c. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 33, n. 9, p. 1155–1160, 2013.

GRAHAM, J. K. Effect of seminal plasma on the motility of epididymal and ejaculated spermatozoa of the ram and bull during the cryopreservation process.

**Theriogenology**, v. 41, n. 5, p. 1151–1162, 1994.

HISHINUMA, M.; SEKINE, J. Separation of canine epididymal spermatozoa by Percoll gradient centrifugation. **Theriogenology**, v. 61, n. 2–3, p. 365–372, 2004.

KAABI, M.; PAZ, P.; ALVAREZ, M.; et al. Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. **Theriogenology**, v. 60, p. 1249–1259, 2003.

KANEKO, T.; FUKUMOTO, K.; HARUGUCHI, Y.; et al. Fertilization of C57BL/6 mouse sperm collected from cauda epididymides after preservation or transportation at 4°C using laser-microdissected oocytes. **Cryobiology**, v. 59, n. 1, p. 59–62, 2009.

KASIMANICKAM, R.; KASIMANICKAM, V.; TIBARY, A.; et al. Effect of semen extenders on sperm parameters of ram semen during liquid storage at 4°C. **Small Ruminant Research**, v. 99, n. 2–3, p. 208–213, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0921448811001532>>. Acesso em: 27/1/2016.

LEAHY, T.; DE GRAAF, S. P. Seminal plasma and its effect on ruminant spermatozoa during processing. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. SUPPL.4, p. 207–213, 2012.

LONE, F. A.; ISLAM, R.; KHAN, M. Z.; et al. Effect of transportation temperature on the quality of cauda epididymal spermatozoa of ram. **Animal reproduction science**, v. 123, n. 1–2, p. 54–59, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432010004471>>. Acesso em: 2/6/2016.

LÓPEZ-PÉREZ, A.; PÉREZ-CLARIGET, R. Ram seminal plasma improves pregnancy rates in ewes cervically inseminated with ram semen stored at 5 °C for 24 hours. **Theriogenology**, v. 77, n. 2, p. 395–399, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X11004171>>. Acesso em: 5/2/2016.

MARTINEZ-PASTOR, F.; GARCIA-MACIAS, V.; ALVAREZ, M.; et al. Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer. **Theriogenology**, v. 65, n. 3, p. 471–485, 2006.

MARTINEZ-PASTOR, F.; GUERRA, C.; KAABI, M.; et al. Decay of sperm obtained from epididymes of wild ruminants depending on postmortem time. **Theriogenology**, v. 63, n. 1, p. 24–40, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X04001037>>. Acesso em: 27/5/2016.

MARTINS, C. F.; DRIESSEN, K.; COSTA, P. M.; et al. 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, n. 1, p. 50–57, 2009.

MATA-CAMPUZANO, M.; ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ, M.; TAMAYO-CANUL, J.; et al.

Refrigerated storage of ram sperm in presence of Trolox and GSH antioxidants: Effect of temperature, extender and storage time. **Animal Reproduction Science**, v. 151, n. 3–4, p. 137–147, 2014. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432014003042>>. .

MATA-CAMPUZANO, M.; SOLEILHAVOUP, C.; TSIKIS, G.; et al. Motility of liquid stored ram spermatozoa is altered by dilution rate independent of seminal plasma concentration. **Animal reproduction science**, v. 162, p. 31–6, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432015300154>>. Acesso em: 11/1/2016.

MELO, C. M.; PAPA, F. O.; FIORATTI, E. G.; et al. Comparison of three different extenders for freezing epididymal stallion sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 107, n. 3–4, p. 331, 2008.

MONTEIRO, G. A.; GUASTI, P. N.; ROCHA, A. S.; et al. Effect of Storage Time and Temperature of Equine Epididymis on the Viability, Motion Parameters, and Freezability of Epididymal Sperm. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, n. 3, p. 169–173, 2013. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2012.06.010>>. .

NEILD, D.; MIRAGAYA, M.; CHAVES, G.; et al. Cryopreservation of cauda epididymis spermatozoa from slaughterhouse testicles 24 hours after ground transportation. **Animal Reproduction Science**, v. 94, n. 1–4, p. 92–95, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432006001187>>. Acesso em: 2/6/2016.

O'HARA, L.; HANRAHAN, J. P.; RICHARDSON, L.; et al. Effect of storage duration, storage temperature, and diluent on the viability and fertility of fresh ram sperm. **Theriogenology**, v. 73, n. 4, p. 541–549, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X09004695>>. Acesso em: 1/2/2016.

RODELLO, L. **Validação de sistema automatizado de refrigeração e congelamento de sêmen ovino**, 2006. Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

RODELLO, L.; BICUDO, S. D.; FALLEIROS, M. B.; et al. Implicações da redução na concentração de gema de ovo no meio glicina-gema-leite sobre a cinética, morfologia e integridade de membranas espermáticas em sêmen ovino criopreservado. **Veterinária e Zootecnia**, v. 18, n. 2, p. 239–248, 2011.

SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, n. 1–3, p. 77–111, 2000.

SARIÖZKAN, S.; ÖZDAMAR, S.; TÜRK, G.; et al. In vitro effects of l-carnitine and glutamine on motility, acrosomal abnormality, and plasma membrane integrity of rabbit sperm during liquid-storage. **Cryobiology**, v. 68, n. 3, p. 349–353, 2014.

TAMAYO-CANUL, J.; ALVAREZ, M.; LÓPEZ-URUEÑA, E.; et al. Undiluted or extended storage of ram epididymal spermatozoa as alternatives to refrigerating the whole epididymes. **Animal reproduction science**, v. 126, n. 1–2, p. 76–82, 2011. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432011001175>>. Acesso em: 1/2/2016.

TITTARELLI, C.; SAVIGNONE, C. A.; ARNAUDÍN, E.; et al. Effect of storage media and storage time on survival of spermatozoa recovered from canine and feline epididymides. **Theriogenology**, v. 66, n. 6–7, p. 1637–1640, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X06000367>>. Acesso em: 13/11/2015.

VÁSQUEZ, J.; FLORENTINI, E. A.; CAMARGO, L. A.; GONZALES, J.; VALDIVIA, M. Hypoosmotic swelling test in epididymal ram (*Ovis aries*) spermatozoa. **Livestock Science**, v. 157, n. 2–3, p. 618–622, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S187114131300396X>>. Acesso em: 11/12/2015.

VÁSQUEZ, J. H.; NÚÑEZ, V. H.; FLORENTINI, E. A.; et al. Effects of five cryoprotective agents on quality of sheep epididymal spermatozoa during pre-freezing. **Livestock Science**, v. 152, n. 1, p. 94–99, 2013.

VERNET, P.; AITKEN, R. J.; DREVET, J. R. Antioxidant strategies in the epididymis. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 216, n. 1–2, p. 31–39, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0303720703004532>>. Acesso em: 4/5/2016.

WEISS, R. R.; MURADAS, P. R.; GRANEMAN, L. C.; et al. Freezing sperm from cauda epididymis of castrated stallions. **Animal Reproduction Science**, v. 107, n. 3–4, p. 356, 2008.

## ARTIGO II

### **QUALIDADE E FERTILIDADE DE ESPERMATOZOIDES CONGELADOS RECUPERADOS DE EPIDÍDIMOS OVINOS ARMAZENADOS EM TEMPERATURA AMBIENTE (18-25°C) ATÉ 48 HORAS APÓS A MORTE**

*Quality and fertility of frozen ovine spermatozoa from epididymides stored at room temperature (18-25°C) for up to 48 hours post mortem*

#### RESUMO

Este estudo investiga o efeito do tempo de armazenamento de epidídimos em temperatura ambiente e da adição de 20% de plasma seminal ao diluidor para criopreservação na qualidade e fertilidade após a descongelação de espermatozoides ovinos recuperados da cauda de epidídimo. A cinética espermática, integridade e estabilidade de membrana plasmática, lesão de acrossoma e fertilidade após inseminação artificial por laparoscopia foram avaliadas em amostras coletadas com vagina artificial (AV) e de epidídimos armazenados em temperatura ambiente por zero (G0), seis (G6), doze (G12), vinte e quatro (G24) e quarenta e oito horas (G48) após a morte. Não houve diferença significativa nos parâmetros espermáticos entre os métodos de coleta, com exceção da motilidade progressiva (PM) e velocidade progressiva (VSL). G48 apresentou menor ( $P < 0,05$ ) motilidade total (TM), PM, parâmetros cinéticos, viabilidade e integridade acrossomal. A taxa de gestação após inseminação foi similar nos grupos AV, G0, G6, G12 e G24. Concluímos que epidídimos ovinos podem permanecer expostos à temperatura ambiente até 24 horas após a morte sem que haja efeitos na viabilidade e fertilidade dos espermatozoides criopreservados. A adição de plasma seminal para criopreservação não teve efeito sobre a viabilidade ou fertilidade dos espermatozoides.

Palavras-chave: epidídimos, plasma seminal, CASA

## 1. Introdução

A preservação de gametas após a morte de um animal geneticamente importante tem aplicações práticas relevantes na pecuária mundial. Além disso, a preservação de gametas após a morte é uma importante ferramenta para a formação de bancos genéticos para animais selvagens, especialmente de espécies ameaçadas de extinção (Kaabi et al., 2003). Alguns autores relataram a recuperação de espermatozoides viáveis da cauda de epidídimo de carneiros (Kaabi et al., 2003), bodes (Blash et al., 2000) , touros (Martins et al., 2009), garanhões (Monteiro et al., 2011), cervídeos (Martínez et al., 2008), cães e gatos (Tittarelli et al., 2006), quando os epidídimos foram mantidos a 5°C. Entretanto, a questão sobre o período máximo após a morte, pelo qual espermatozoides colhidos de epidídimos mantidos à temperatura ambiente permanecem viáveis para a congelação e fertilização, não está bem elucidada. Os espermatozoides da cauda de epidídimo são suscetíveis à variação de temperatura ambiental (Kaabi et al., 2003; Martinez-Pastor et al., 2005c; Lone et al., 2011; Monteiro et al., 2013) . Alguns pesquisadores investigaram o período máximo de viabilidade espermática de caudas de epidídimos mantidas refrigeradas a 5°C (Martins et al.,2009; Vieira et al., 2013), entretanto, na realidade, a maioria dos animais domésticos e selvagens são encontrados mortos após permanecerem expostos à temperatura ambiente por algum tempo.

Estudos relatam que alguns componentes do plasma seminal são capazes de prevenir ou reverter danos causados pela variação de temperatura nos espermatozoides de ovinos (Domínguez et al., 2008). Os espermatozoides colhidos da cauda de epidídimo não possuem essa proteção promovida pelo plasma seminal. A adição de plasma seminal aos espermatozoides coletados do epidídimo estimula a motilidade inicialmente (Dott et al., 1979) e tem efeito benéfico após descongelação (Graham, 1994). Quando o plasma seminal é adicionado aos espermatozoides epididimários de suínos, no meio de descongelação, alguns autores observaram aumento na taxa de gestação e tamanho da leitegada (Okazaki et al., 2012). Até onde sabemos, não existem relatos do potencial de fertilização de espermatozoides epididimários ovinos criopreservados com a adição de plasma seminal.

Os objetivos deste trabalho foram: (1) Avaliar a viabilidade e fertilidade de espermatozoides epididimários ovinos após descongelação quando os epidídimos foram mantidos à temperatura ambiente (18-25°C) por 48 horas após a morte, usando

como controle sêmen coletado em vagina artificial; (2) Avaliar a adição de 20% de plasma seminal ao diluidor para criopreservação de sêmen ovino coletado em vagina artificial e da cauda de epidídimo.

## 2. Material e métodos

### 2.1. Projeto do experimento

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Campus de Ciência Agrárias da Universidade Federal do Paraná, protocolo número 052/2016.

Foram utilizados 10 carneiros sem raça definida com idade entre 12 e 24 meses. Os animais permaneceram em sistema intensivo, com acesso à pastagem de campo nativo durante o dia e confinados no período da noite. Recebiam suplementação alimentar com milho, farelo de soja e mistura de minerais. O fornecimento de água foi *ad libitum*.

Com o uso de uma ovelha como manequim, a coleta do sêmen foi realizada pelo método de vagina artificial (AV). A temperatura interna final da vagina artificial foi de 40°C à 43°C. As coletas em AV foram realizadas duas vezes por semana, durante o período de dois meses, fora da estação reprodutiva (janeiro e fevereiro), e, posteriormente, esses animais foram encaminhados para o abate. Após o abate, um corte transversal foi realizado na região do funículo espermático para excisão do escroto contendo testículos e epidídimos. As peças anatômicas foram transportadas ao laboratório, em no máximo uma hora, em caixa de isopor à temperatura ambiente (15-25°C). No laboratório, os escrotos, testículos e epidídimos foram retirados da caixa de isopor e alocados em copos Becker vazios, mantidos em temperatura ambiente e cobertos com toalha de papel até o final do período de exposição à temperatura ambiente.

Os escrotos, testículos e epidídimos foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos, correspondentes ao período de exposição das peças anatômicas à temperatura ambiente: zero horas (G0), seis horas (G6), doze horas (G12), vinte e

quatro horas (G24) e quarenta e oito horas (G48). Cada grupo foi constituído de quatro epidídimos, provenientes de quatro carneiros distintos.

## 2.2. Coleta dos espermatozoides após a morte

No laboratório, com lâmina de bisturi, foi realizada a incisão na pele do escroto para excisão dos testículos e epidídimos (Vásquez et al., 2013). Os testículos e epidídimos foram lavados com solução de cloreto de sódio a 0,09% aquecido a 35°C, em seguida, a secção da região de junção entre corpo e cauda dos epidídimos foi realizada. As caudas dos epidídimos foram alocadas em placas de Petri aquecidas e mantidas a 35°C. Utilizando pinça anatômica, tesouras e lâmina de bisturi, os vasos sanguíneos superficiais e aparentes foram dissecados e perfurados para evitar a contaminação dos espermatozoides com o sangue. Na sequência, foram realizados cortes transversais e leve pressão sobre a cauda de epidídimo para que os espermatozoides contidos nos túbulos fossem removidos (Kaabi et al. 2003) em 2mL do CM aquecido a 35°C. Após cinco minutos, os espermatozoides diluídos foram pipetado da placa de Petri em tubo cônico (BD Falcon) (Martinez-Pastor et al. 2006b).

## 2.3. Criopreservação

O meio controle (CM) usado na criopreservação foi constituído de 75mL de solução mãe (200mL água destilada, 1,4g glicina, 2,97g citrato de sódio, 3g frutose, 0,004g amicacina), 15mL de leite desnatado a 11%, 5g gema de ovo e 4,6 mL de água destilada e 4% de glicerol (Rodello et al., 2011). No CM foi adicionado 20% de plasma seminal para constituir o meio SP. O plasma seminal foi proveniente dos mesmos carneiros utilizados na coleta de sêmen com vagina artificial durante o verão (Janeiro e Fevereiro). A obtenção do plasma seminal e produção do meio diluidor com plasma seminal seguiu a metodologia de (López-Pérez e Pérez-Clariget, 2012).

A diluição das doses com os meios CM e SP foi realizada a fim de obter a concentração final de 400 milhões de espermatozoides totais por mL. As doses

inseminantes foram envasadas em palhetas francesas com volume de 0,25mL e 100 milhões de espermatozoides totais por dose. As doses foram congeladas em equipamento automatizado (TK 3000<sup>®</sup>, TK Congelações, Brasil) com curva padrão para congelamento de sêmen ovino “S2P3” que decresce da temperatura ambiente até 5°C na razão de 0,5°C por minuto. As doses foram estabilizadas em 5°C por duas horas, e, em seguida, a temperatura voltava a cair 15°C por minuto até atingir -80°C, na razão de 10°C por minuto até -120°C. Neste momento, as palhetas foram submersas em nitrogênio líquido. As amostras foram descongeladas em banho-maria a 40°C por 20 segundos. A qualidade espermática foi avaliada imediatamente após a descongelação.

## 2.4. Avaliação espermática

### 2.4.1. Cinética espermática

A Análise de Cinética Espermática Assistida por Computador (CASA) foi realizada em equipamento Hamilton Thorn Motility Analyser – HTMA –IVOS 12 – Hamilton Research – Beverly, MA, USA. Para avaliação da cinética espermática, 30µL do sêmen congelado/descongelado foi diluído em 300µL de CM previamente aquecido e mantido a 37°C. O volume de 6µL do sêmen diluído foi depositado na câmara de Makler (Makler Counting Chamber – Selfi-Medical, Haifa, Israel). Aleatoriamente, três campos da câmara foram escolhidos e analisados para motilidade total (TM,%), motilidade progressiva (PM,%), velocidade de trajeto (VAP, µm/s), velocidade progressiva (VSL, µm/s), velocidade curvilínea (VCL, µm/s), amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH, µm), frequência de batimentos do flagelo (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %) e linearidade (LIN, %). O *setup* utilizado foi baseado nas indicações do fabricante obtidas por meio do manual de uso do equipamento (HAMILTON THORNE SETUP FOR IVOS-12.3), sendo que o tamanho da célula foi de 5 pixels, intensidade da célula 55, VAP 75 µ/s, STR 80%, VAP *cutoff* 21,9 µ/s, VSL *cutoff* 6,0 µ/s, intensidade de estáticos mínimo 0,25 e máximo 1,5, tamanho de estáticos mínimo 0,6 e máximo 8,0 e alongação de estáticos mínimo 0 e máximo 95.

A magnificação foi de 1,95, frequência de vídeo 60 Hz, intensidade de iluminação 2400, fotômetro baixo 73 e alto 125.

#### 2.4.2. Citometria de fluxo

A avaliação espermática por citometria de fluxo foi realizada em equipamento BD LSR Fortessa (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) equipado com lasers: azul 488-nm, 100 mW, vermelho 640-nm, 40 mW e violeta 405-nm, 100 mW. Após a análise, os dados foram avaliados por programa do mesmo fabricante BD FACSDiva™ software v6.1.

##### 2.4.2.1. Viabilidade espermática e integridade da membrana acrossomal

Para a avaliação da integridade da membrana plasmática e acrossomal foi utilizada a associação de sondas Iodeto de Propídio (IP; P4170, Sigma), aglutinina do *Pisum sativum* conjugada ao Isotiocionato de Fluoresceína (FITC-PSA; L-0770, Sigma) e Hoechst 33342 (H324; 14533, Sigma) de acordo com protocolo desenvolvido por Freitas-Dell'aqua et al. (2012). Em todas as análises em citometria de fluxo, o H33342 foi usado para eliminar os eventos não espermáticos. Em uma amostra de 200µL de sêmen diluído em meio TALP (concentração de  $5 \times 10^6$  espermatozoides/mL) foram adicionados 5µL de IP (50µg/mL), 10µL de H324 (100 µg/mL) e 0,25µL de FITC-PSA (1 mg/mL) Em seguida, as amostras foram homogeneizadas e incubados por 8 minutos a 37°C. Após a leitura em citometria de fluxo, os espermatozoides foram classificados em categoria 1 (CAT 1, FIT-PSA-/IP+), com membrana plasmática lesada e membrana acrossomal não reagida; categoria 2 (CAT 2, FIT-PSA+/IP-), com membrana plasmática íntegra e membrana acrossomal reagida; categoria 3 (CAT 3, FIT-PSA-/IP+), com membrana plasmática íntegra e membrana acrossomal não reagida; categoria 4 (CAT 4, FIT-PSA+/IP+), com membrana plasmática lesada e membrana acrossomal reagida (Celeghini et al. 2008). Para a avaliação da porcentagem de espermatozoides com acrossoma reagido foram somadas as CAT 2 e CAT 4.

#### 2.4.2.2. Viabilidade espermática e estabilidade de membrana plasmática

Para aferição da viabilidade espermática e estabilidade da membrana plasmática dos espermatozoides, foi utilizada a associação de sondas Merocianina 540 (M540), YO-PRO1 e H324. A solução de trabalho foi formulada com 1µL de YO-PRO1 (25µM em DMSO), 2,6µL de M540 (1mM em DMSO), 10µL de H324 (100 µg/mL) e 100 µL de TALP. As amostras foram submetidas a incubação a 37°C por 8 minutos em banho-maria. Os espermatozoides foram classificados em categoria 1 (CAT 1, YOPRO1+/M540-), mortos; categoria 2 (CAT 2, YOPRO1-/M540-), viáveis com estabilidade de membrana plasmática; categoria 3 (CAT3, YOPRO1-/M540+), viáveis com instabilidade de membrana plasmática (Hallap et al., 2006). Para a avaliação das células com membrana espermática instável foi considerada a CAT3. Para a avaliação dos espermatozoides viáveis foram somadas as categorias CAT1 e CAT2.

#### 2.5. Inseminação artificial

Cem ovelhas (idade entre 9 e 36 meses), sem raça definida, foram submetidas ao protocolo de sincronização de estro com implante intravaginal impregnado com 60mg de acetato de medroxiprogesterona (Progespon<sup>®</sup>, Zoetis, Estados Unidos) pelo período de 14 dias ao final da estação reprodutiva (Julho). Cinco ovelhas perderam os implantes e foram excluídas do experimento antes da inseminação artificial. No dia da retirada do implante, foi administrado 500UI de eCG (Novormon<sup>®</sup>, Zoetis, Estados Unidos) (Anel et al., 2005). As ovelhas foram distribuídas aleatoriamente nos grupos (AV, G0, G6, G12, G24, CM e SP). As amostras do G48 não foram utilizadas na inseminação artificial por apresentarem valores muito baixos de TM e PM. A dose inseminante foi de 100 milhões de espermatozoides totais.

A inseminação artificial (AI) foi realizada entre 50 e 56 horas após a retirada do implante intravaginal de progesterona. Após jejum sólido e líquido de doze horas, as ovelhas foram sedadas com 0,05mL/Kg de acepromazina e contidas em macas na posição de Trendelenburg. Os cornos uterinos foram observados com a óptica

laparoscópica de 5mm e 30° de angulação (Karl Stroz, Tuttlingen, German). As doses inseminantes foram depositados na luz dos cornos uterinos, na região média da curvatura maior de cada corno, utilizando uma pipeta de Robertson (Minitube Brasil, Porto Alegre, Brasil) (Anakkul et al., 2014). O diagnóstico ultrassonográfico de gestação foi realizado pela via transabdominal aos 60 dias após a AI com probe linear de 5mHz (DP2200 VET, Mindray Medical International Limited, Shenzhen, China).

## 2.6. Análise estatística

As análises das amostras foram de ordem pareada e os dados foram analisados em delineamento de blocos ao acaso com seis (AV, G0, G6, G12, G24 e G48) ou dois (CM, SP) grupos e dez (AV) ou quatro (G0, G6, G12, G24 e G48) tratamentos. Para a análise dos dados, foram utilizadas as médias dos valores obtidos em cada tratamento. As variáveis apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variâncias pelo método Kolmogorov-Smirnov, sendo utilizado como métodos estatísticos ANOVA, seguido pelo teste de Tukey nas análises dos grupos e teste-t pareado nas análises dos meios diluidores. O programa estatístico utilizado foi o Action® versão 2.6.216.366, com nível de significância de 5%.

## 3. Resultados

### 3.1. Recuperação espermática

O volume de sêmen coletado em vagina artificial ( $1.1 \pm 0.2\text{mL}$ ) foi significativamente menor quando comparado às amostras coletadas da cauda de epidídimo ( $G0=3.1 \pm 0.7$ ;  $G6=2.6 \pm 0.3$ ;  $G12=3.0 \pm 0.4$ ;  $G24=2.8 \pm 0.5\text{mL}$ ), entretanto o volume de espermatozoides recuperado 48 horas após a morte ( $G48=1.9 \pm 0.6\text{mL}$ ) foi menor ( $P<0,05$ ), quando comparado aos outros grupos das amostras coletadas da cauda de epidídimo. O número total de espermatozoides recuperados foi superior nos

grupos G0 ( $2,6 \pm 1,0 \times 10^9$ ), G12 ( $6,9 \pm 1,5 \times 10^9$ ) e G24 ( $4,2 \pm 2,4 \times 10^9$ ) quando comparado ao G48 ( $2,0 \pm 1,3 \times 10^9$ ) e a AV ( $2,6 \pm 1,0 \times 10^9$ ).

### 3.2. Análises pós-descongelção

A média  $\pm$  desvio padrão da motilidade total, motilidade progressiva, porcentagem de espermatozoides viáveis, porcentagem de lesões de acrossoma e porcentagem de espermatozoides com instabilidade de membrana estão descritas na Tabela 1. A TM diminuiu ( $P < 0,05$ ) no G48. A PM foi maior ( $P < 0,05$ ) no grupo AV quando comparado às amostras recuperadas após a morte. O G48 teve a menor ( $P < 0,05$ ) porcentagem de PM e células viáveis quando comparado aos outros grupos de espermatozoides recuperados do epidídimo. A maior ( $P < 0,05$ ) incidência de espermatozoides com acrossoma lesado foi identificado no G48. A porcentagem de espermatozoides com instabilidade de membrana não diferiu entre os grupos avaliados (Tabela 1).

TABELA 1. MÉDIA  $\pm$  DESVIO PADRÃO DA TM(%), PM (%), VIABILIDADE (%), YOPRO(-), LESÃO DE ACROSSOMA (%), FIT-PSA+) E INSTABILIDADE DE MEMBRANA PLASMÁTICA (%), M540+) DAS AMOSTRAS DESCONGELADAS COLETADAS EM VAGINA ARTIFICIAL (AV) E DA CAUDA DE EPIDÍDIMOS MANTIDOS À TEMPERATURA AMBIENTE 0, 6, 12, 24 E 48 HORAS *POST MORTEM*.

	TM	PM	Viabilidade	Lesão de acrossoma	Instabilidade de membrana
AV	$56,3 \pm 22,5^a$	$26,8 \pm 14,3^a$	$18,9 \pm 9,4^{ab}$	$23,1 \pm 8,6^a$	$2,7 \pm 2,9^a$
G0	$34,1 \pm 26,9^{ab}$	$11,7 \pm 9,8^b$	$15,4 \pm 9,2^a$	$30,67 \pm 9,7^a$	$2,4 \pm 1,9^a$
G6	$54,6 \pm 20,9^a$	$13,1 \pm 7,9^b$	$24,5 \pm 8,3^a$	$25,5 \pm 9,7^a$	$1,5 \pm 1,3^a$
G12	$38 \pm 23,2^{ab}$	$3,1 \pm 3,8^{bc}$	$21,4 \pm 11,3^a$	$27,0 \pm 12,1^a$	$3,1 \pm 2,1^a$
G24	$28,6 \pm 17,9^{ab}$	$2,1 \pm 1,7^{bc}$	$22,7 \pm 11,9^a$	$30,8 \pm 17,7^a$	$2,9 \pm 2,4^a$
G48	$6,1 \pm 7,0^b$	$0 \pm 0^c$	$5,1 \pm 5,5^b$	$57,1 \pm 18,6^b$	$0,9 \pm 0,5^a$

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre os resultados.

ALH, BCF, STR e LIN não diferiram entre os grupos AV, G0, G6, G12 e G24, porém, valores menores ( $P < 0,05$ ) foram observados no G48 quando comparados aos outros grupos. A VSL foi superior ( $P < 0,05$ ) no grupo AV quando comparado a todos os grupos de amostras recuperadas dos epidídimos. A VAP e VCL dos grupos AV e G0 não diferiram entre si e foram maiores ( $P < 0,05$ ) quando comparados ao G6, G12,

G24 e G48. O G48 teve o menor ( $P<0,05$ ) VAP quando comparado a todos os outros grupos (Tabela 2).

TABELA 2. MÉDIA  $\pm$  DESVIO PADRÃO DA VAP( $\mu$ M/S), VSL(M/S), VCL( $\mu$ M/S), ALH( $\mu$ M), BCF(HZ), STR (%) E LIN (%) DAS AMOSTRAS DESCONGELADAS COLETADAS EM VAGINA ARTIFICIAL (AV) E DA CAUDA DE EPIDÍDIMOS MANTIDOS À TEMPERATURE AMBIENTE 0, 6, 12, 24 E 48 HORAS *POST MORTEM*.

	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN
AV	95,6 $\pm$ 13,5 <sup>a</sup>	76,2 $\pm$ 12,5 <sup>a</sup>	187,0 $\pm$ 22,7 <sup>a</sup>	8,2 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	38,5 $\pm$ 2,3 <sup>a</sup>	75,3 $\pm$ 3,1 <sup>a</sup>	39,7 $\pm$ 1,5 <sup>a</sup>
G0	74,7 $\pm$ 10,3 <sup>a</sup>	57,1 $\pm$ 5,9 <sup>b</sup>	159,7 $\pm$ 18,0 <sup>ab</sup>	7,6 $\pm$ 0,7 <sup>a</sup>	39,6 $\pm$ 4,0 <sup>a</sup>	72,5 $\pm$ 4,5 <sup>a</sup>	35,3 $\pm$ 2,4 <sup>a</sup>
G6	65,4 $\pm$ 11,0 <sup>b</sup>	49,3 $\pm$ 9,1 <sup>bc</sup>	132,6 $\pm$ 19,7 <sup>b</sup>	7,2 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	37,4 $\pm$ 2,5 <sup>a</sup>	72,4 $\pm$ 6,3 <sup>a</sup>	38,1 $\pm$ 4,4 <sup>a</sup>
G12	54,6 $\pm$ 9,5 <sup>b</sup>	35,2 $\pm$ 7,5 <sup>c</sup>	121,4 $\pm$ 15,2 <sup>b</sup>	6 $\pm$ 2,8 <sup>a</sup>	34,8 $\pm$ 2,24 <sup>a</sup>	65,3 $\pm$ 6,2 <sup>a</sup>	32,6 $\pm$ 4,2 <sup>a</sup>
G24	57,6 $\pm$ 6,8 <sup>b</sup>	37,9 $\pm$ 7,9 <sup>c</sup>	122,1 $\pm$ 9,2 <sup>b</sup>	6,5 $\pm$ 2,1 <sup>a</sup>	34,3 $\pm$ 3,8 <sup>a</sup>	65,5 $\pm$ 4,1 <sup>a</sup>	33,0 $\pm$ 3,0 <sup>a</sup>
G48	29,3 $\pm$ 27,6 <sup>c</sup>	14,7 $\pm$ 12,6 <sup>d</sup>	66,2 $\pm$ 59,4 <sup>c</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>b</sup>	20,1 $\pm$ 18,5 <sup>b</sup>	33,6 $\pm$ 28,5 <sup>b</sup>	15,5 $\pm$ 14,4 <sup>b</sup>

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ( $P<0,05$ ) entre os resultados

### 3.3. Meios diluidores e fertilidade

As amostras coletadas em vagina artificial e criopreservadas em CM tiveram maior ( $P<0,05$ ) TM que a amostra do grupo G48 criopreservadas com CM ou SP. A TM não diferiu em nenhum outro grupo. A PM foi maior ( $P<0,05$ ) no grupo AV criopreservado com CM quando comparada a todos os outros grupos. O G6 CM apresentou maior ( $P<0,05$ ) viabilidade quando comparado ao G48 SP, porém, não diferiu dos outros grupos. G48 teve maior ( $P<0,05$ ) porcentagem de lesões de acrossoma quando comparado ao grupo AV CM e o G6 SP. A porcentagem de células com instabilidade de membrana plasmática não diferiu entre os grupos. A PM do grupo AV foi o único parâmetro que diferiu ( $P<0,05$ ) entre os meios diluidores utilizados.

TABELA 3. MÉDIA  $\pm$  DESVIO PADRÃO DA TM (%), PM (%), VIABILIDADE (%), YOPRO-), LESÃO DE ACROSSOMA (%), FIT-PSA+), ESPERMATOZOÍDES COM INSTABILIDADE DE MEMBRANA PLASMÁTICA(%), M540+), NÚMERO DE OVELHAS GESTANTES AOS 60 DIAS E NÚMERO DE OVELHAS INSEMINADAS E TAXA DE GESTAÇÃO DAS AMOSTRAS CONGELADAS COM MEIO CONTROLE(CM) E CM ADICIONADO 20% DE PLASMA SEMINAL (SP), COLETADAS EM VAGINA ARTIFICIAL (AV) E DA CAUDA DE EPIDÍDIMOS MANTIDOS EM TEMPERATURA AMBIENTE POR 0, 6, 12, 24 E 48 HORAS APÓS A MORTE.

		TM	PM	Viabilidade	Lesão de Acrossoma	Instabilidade de membrana	Gestantes/ Inseminadas	Taxa de gestação
AV	CM	75.5 $\pm$ 10.0 <sup>a</sup>	37.3 $\pm$ 11.5 <sup>a</sup>	12.3 $\pm$ 1.3 <sup>ab</sup>	18.9 $\pm$ 4.3 <sup>b</sup>	1.4 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>	2/13	15.4 <sup>a</sup>
	SP	37.0 $\pm$ 6.55 <sup>abc</sup>	16.3 $\pm$ 7,0 <sup>b</sup>	20.1 $\pm$ 8.2 <sup>ab</sup>	27.3 $\pm$ 10.5 <sup>ab</sup>	4.0 $\pm$ 3.9 <sup>a</sup>	2/13	15.4 <sup>a</sup>
G0	CM	37.5 $\pm$ 33.9 <sup>abc</sup>	13.0 $\pm$ 11.5 <sup>b</sup>	13.0 $\pm$ 2.0 <sup>ab</sup>	35.0 $\pm$ 6.3 <sup>ab</sup>	3.8 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	2/7	28.6 <sup>a</sup>
	SP	31.4 $\pm$ 23.5 <sup>abc</sup>	10.8 $\pm$ 9,5 <sup>b</sup>	17.2 $\pm$ 11.8 <sup>ab</sup>	36.9 $\pm$ 19.6 <sup>ab</sup>	1.9 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>	0/10	0.0 <sup>a</sup>
G6	CM	58.5 $\pm$ 19.3 <sup>ab</sup>	15.25 $\pm$ 9.0 <sup>b</sup>	23.4 $\pm$ 8.8 <sup>a</sup>	32.1 $\pm$ 7.1 <sup>ab</sup>	2.2 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	2/7	28.6 <sup>a</sup>
	SP	50.7 $\pm$ 24.7 <sup>abc</sup>	11.0 $\pm$ 7.0 <sup>b</sup>	22.5 $\pm$ 7.9 <sup>ab</sup>	18.8 $\pm$ 7.1 <sup>b</sup>	0.7 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	2/7	28.6 <sup>a</sup>
G12	CM	44.25 $\pm$ 19.9 <sup>abc</sup>	3.0 $\pm$ 3.4 <sup>b</sup>	16.65 $\pm$ 10.7 <sup>ab</sup>	34.3 $\pm$ 8.0 <sup>ab</sup>	4.4 $\pm$ 2.2 <sup>a</sup>	1/8	12.5 <sup>a</sup>
	SP	29.6 $\pm$ 28.8 <sup>abc</sup>	3.3 $\pm$ 4.9 <sup>b</sup>	19.8 $\pm$ 13.5 <sup>ab</sup>	19.5 $\pm$ 11.2 <sup>b</sup>	1.8 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>	4/10	40.0 <sup>a</sup>
G24	CM	33.25 $\pm$ 24.1 <sup>abc</sup>	2.75 $\pm$ 2.3 <sup>b</sup>	17.8 $\pm$ 4.8 <sup>ab</sup>	30.4 $\pm$ 11.1 <sup>ab</sup>	3.15 $\pm$ 3.3 <sup>a</sup>	0/10	0.0 <sup>a</sup>
	SP	24.0 $\pm$ 10.5 <sup>abc</sup>	1.5 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>	21.8 $\pm$ 15.0 <sup>ab</sup>	31.2 $\pm$ 24.6 <sup>ab</sup>	2.5 $\pm$ 1.3 <sup>a</sup>	3/10	30.0 <sup>a</sup>
G48	CM	10.6 $\pm$ 9.7 <sup>bc</sup>	0.0 $\pm$ 0.0 <sup>b</sup>	1.9 $\pm$ 0.8 <sup>b</sup>	51.2 $\pm$ 19.8 <sup>a</sup>	0.4 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	-	-
	SP	3.0 $\pm$ 4.24 <sup>c</sup>	0.0 $\pm$ 0.0 <sup>b</sup>	6.6 $\pm$ 6.5 <sup>ab</sup>	59.0 $\pm$ 19.7 <sup>a</sup>	1.2 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	-	-

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre os resultados.

O número de ovelhas prenhas e inseminadas e a taxa de gestação após IA por laparoscopia utilizando sêmen colhido em AV ou da cauda de epidídimos mantidos à temperatura ambiente por 0, 6, 12, 24, 48 horas após a morte e congelados em CM ou SP estão descritos na Tabela 3. Apesar da taxa de gestação apresentar variações em seus valores absolutos, não houve diferença entre os grupos e meios utilizados quando os testes estatísticos foram realizados. Nenhuma ovelha dos grupos G0 SP e G24 CM estava gestante no momento do exame ultrassonográfico.

#### 4. Discussão

Este estudo avaliou o período máximo de exposição de epidídimos ovinos à temperatura ambiente pelo qual espermatozoides viáveis podem ser recuperados e congelados.

As análises após descongelação dos espermatozoides epididimários coletados imediatamente após a morte resultaram em valores de motilidade total, viabilidade,

lesão de acrossoma e instabilidade de membrana similares às amostras provenientes de ejaculação. Alguns autores relataram que os espermatozoides da cauda de epidídimo podem ser descongelados com resultados similares ou superiores ao sêmen ejaculado (Monteiro et al., 2011; Álvarez et al., 2012). A TM das amostras coletadas dos epidídimos não diferiu da AV até 24 horas após a morte. Resultados similares foram relatados por outros autores em bovinos (Martins et al., 2009) e ovinos (Kaabi et al., 2003; Tamayo-Canul et al., 2011; Álvarez et al., 2012). A PM foi menor ( $P < 0,05$ ) em todas as amostras epididimárias quando comparadas ao grupo AV, provavelmente como resultado do grande número de gotas citoplasmáticas distais frequentemente observadas no monitor do CASA. Bertol et al. (2016) relataram grande número de gotas citoplasmáticas mediais e distais nos espermatozoides recuperados da cauda de epidídimo de touros. Segundo Ehling et al. (2006), as gotas citoplasmáticas identificadas em espermatozoides recuperados da cauda de epidídimo não são consideradas anormais devido à origem das células.

O período após a morte afetou a PM, corroborando outros autores (Monteiro et al., 2013). Martinez-Pastor et al. (2005c), trabalhando com ruminantes selvagens, reportou o aumento da osmolaridade como reflexo da degeneração do epidídimo e que existe uma correlação negativa entre a motilidade e o tempo entre a morte do animal e a recuperação dos espermatozoides. Segundo Songsasen et al. (1998), a degeneração dos túbulos epididimários, em ratos, tem início 12 horas após a morte. A diminuição da TM e PM encontrada em nosso estudo está de acordo com outros autores, que associaram a depreciação da qualidade espermática após a morte com a autólise de células do epidídimo e alterações do ambiente epididimário (Tittarelli et al., 2006; Gañán et al., 2009; Tittarelli et al., 2012).

A VAP e a VCL não diferiram entre o grupo VA e o G0, porém, diminuíram ( $P < 0,05$ ) gradativamente a partir do G6. O G48 apresentou menores ( $P < 0,05$ ) valores de VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, STR e LIN quando comparados a todos os outros grupos. Segundo Nichi et al. (2016), quando os epidídimos são expostos a altas temperaturas antes do congelamento, o potencial mitocondrial diminui significativamente. Consideramos a hipótese de que a exposição dos epidídimos à temperatura ambiente pode alterar o padrão de movimento dos espermatozoides, resultando na diminuição da velocidade de migração destas células no trato reprodutivo feminino. Cox et al. (2006), ao avaliar sêmen caprino, identificaram que

ejaculados com maiores valores de VCL, VAP e VSL apresentaram maior eficiência no teste migração no muco cervical. Entretanto, estudos em humanos (Fréour et al., 2010), ovinos (O'Meara et al., 2008), garanhões e touros (Mocé e Graham, 2008) não encontraram relação entre os parâmetros cinéticos avaliados no CASA e a fertilidade.

As membranas plasmáticas e acrossomais aparentemente suportam melhor as condições pós-morte (Martinez-Pastor et al., 2005c) quando comparadas a outros parâmetros de qualidade espermática, como a motilidade e cinética. Alguns autores (Monteiro et al., 2011; Álvarez et al., 2012) levantaram a hipótese de que o sêmen proveniente da cauda de epidídimo seria resiliente ao choque térmico e a alterações osmóticas e, conseqüentemente, à criopreservação. Esta hipótese não pode ser comprovada no presente trabalho visto que não houve diferença de viabilidade e lesão acrossomal quando comparamos os grupos AV e G0 (Tabela 3). A viabilidade e integridade de acrossoma diminuíram ( $P < 0,05$ ) no G48, provavelmente como consequência da degeneração dos túbulos seminíferos, aumento da osmolaridade e pH (Tamayo-Canul et al., 2011) decorrente do período após a morte. Kaabi et al. (2003) também observaram o aumento de lesão de acrossoma, decorridas 48 horas após a morte, em sêmen criopreservado de ovinos.

Ao entrar em contato com o trato reprodutivo feminino, o espermatozoide sofre mudanças estruturais e metabólicas que levam o nome de capacitação (Bergstein et al., 2014). Uma indicação precoce de capacitação é a desorganização da bicamada lipídica da membrana plasmática (Steckler et al., 2015), que pode ser monitorada com o uso da sonda Merocianina 540 (Hallap et al., 2006).

Alguns autores relataram que espermatozoides colhidos da cauda de epidídimo de garanhões seriam incapazes ou menos capazes de sofrer o processo de capacitação (Vieira et al., 2013). Em contrapartida, Okazaki et al. (2012) concluíram que o sêmen advindo da cauda de epidídimo de cachorros possui maior estado de capacitação quando comparado ao sêmen proveniente de ejaculação. No presente estudo, não houve diferença ( $P > 0,05$ ) na incidência de espermatozoides com instabilidade de membrana plasmática quando comparado o grupo AV e todos os outros grupos estudados (Tabela 3). Contudo, nenhum protocolo com objetivo de promover a capacitação espermática foi utilizado.

A adição do plasma seminal ao meio diluidor para criopreservação não surtiu efeito em nenhum parâmetro espermático, tampouco na fertilidade. A exceção foi a PM do grupo AV que foi maior ( $P < 0,05$ ) nas amostras criopreservadas com CM quando comparado ao SP, provavelmente como resultado de um efeito individual, visto que o sêmen colhido em AV possuiu o plasma seminal natural. A ineficácia do plasma seminal difere de resultados relatados por outros autores que adicionaram o plasma seminal ao meio de refrigeração (López-Pérez e Pérez-Clariget, 2012; Mata-Campuzano et al., 2015), criopreservação (Martínez-Pastor, et al., 2006; Martins et al., 2016) ou avaliaram a fertilidade (López-Pérez e Pérez-Clariget, 2012). Entretanto, outros autores (El-Hajj Ghaoui et al., 2007; O'Meara et al., 2007) reportaram que a adição do plasma seminal ao sêmen criopreservado não altera sua fertilidade após inseminação artificial cervical ou intrauterina em ovelhas. Os efeitos contraditórios, provavelmente, são resultado da grande variabilidade de componente orgânicos e inorgânicos encontrados no plasma seminal de carneiros (O'Meara et al., 2007). A composição do plasma seminal e seu efeito sobre a qualidade e fertilidade do sêmen pode variar conforme a espécie (Way et al., 2000), o método de coleta (Marco-Jiménez et al., 2008), o indivíduo (Rickard et al., 2016) e a estação do ano, no caso de ovinos (Leahy et al., 2010). Consideramos a hipótese de que o plasma seminal coletado no verão possa ser responsável pelos resultados encontrados. Domínguez et al. (2008) relatou que as concentrações das proteínas plasmáticas do plasma seminal são maiores no outono (31 mg/mL), se comparada ao inverno, primavera e verão (21; 10,5; 21,2 mg/mL respectivamente).

A taxa de gestação, após inseminação por laparoscopia, foi menor que a relatada por outros autores após inseminação com espermatozoides ovinos recuperados de epidídimos (Álvarez et al., 2012) ou após a ejaculação (El-Hajj Ghaoui et al., 2007; Álvarez et al., 2012). É possível que o período tardio (final da estação reprodutiva) da inseminação artificial e o grande número de ovelhas jovens possam ter contribuído para esses resultados. Não houve diferença significativa entre a taxa de gestação após inseminação artificial entre os grupos AV e espermatozoides epididimários (Tabela 3). Este resultado corrobora os relatados por Monteiro et al. (2011), que encontraram taxa de gestação similar entre éguas inseminadas com espermatozoides recuperados da cauda de epidídimo e ejaculados. Álvarez et al. (2012) reportaram taxas gestacionais similares após inseminação laparoscópica com

ejaculados, eletro ejaculados e espermatozoides recuperados de epidídimos. Alguns autores descreveram que a fertilidade dos espermatozoides epididimários ovinos decresce a partir de 48 horas após a morte quando os epidídimos foram mantidos refrigerados (Kaabi et al., 2003). Segundo Abella et al. (2015), a maior parte dos espermatozoides epididimários que possuem motilidade também possuem capacidade fertilizante. No nosso estudo, todas as amostras testadas no ensaio de fertilidade mantiveram TM mínima de 24%, conseqüentemente todas as amostras mantiveram o número mínimo de espermatozoides móveis após a descongelação resultando em fertilidade satisfatória (Salamon e Maxwell, 1995; Cseh et al., 2012).

#### 4.1. Conclusões

Concluimos que os parâmetros avaliados, com exceção da PM e VSL, não diferiram entre o sêmen ovino coletado em vagina artificial e os espermatozoides recuperados da cauda de epidídimo, nas condições deste estudo. Foi possível criopreservar espermatozoides recuperados da cauda de epidídimo expostos à temperatura ambiente até 24 horas após a morte, sem alteração da viabilidade e da fertilidade. Finalmente, a adição de 20% de plasma seminal ao diluidor para criopreservação não teve efeito sobre a viabilidade espermática e fertilidade.

#### Agradecimentos

T.G. Bergstein-Galan recebeu bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES (Brasil).

#### REFERÊNCIAS

ABELLA, D. F.; COSTA, M. DA; GUÉRIN, Y.; et al. L. Fertility of undiluted ram epididymal spermatozoa stored for several days at 4 ° C. **Animal**, v. 9, n. 2, p. 313–319, 2015.

ALVAREZ, M.; TAMAYO-CANUL, J.; ANEL, E.; et al. Sperm concentration at freezing affects post-thaw quality and fertility of ram semen. **Theriogenology**, v. 77, n. 6, p. 1111–1118, 2012. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.10.013>>. .

ÁLVAREZ, M.; TAMAYO-CANUL, J.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, C.; et al. Specificity of the extender used for freezing ram sperm depends of the spermatozoa source (ejaculate, electroejaculate or epididymis). **Animal reproduction science**, v. 132, n. 3–4, p. 145–154, 2012. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432012001339>>. Acesso em: 1/2/2016.

ANAKKUL, N.; SUWIMONTEERABUTR, J.; THARASANIT, T.; et al. Sperm distribution and fertilization after unilateral and bilateral laparoscopic artificial insemination with frozen-thawed goat semen. **Theriogenology**, v. 82, n. 8, p. 1137–44, 2014. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X14003987>>. Acesso em: 15/2/2016.

ANEL, L.; KAABI, M.; ABROUG, B.; et al. Factors influencing the success of vaginal and laparoscopic artificial insemination in churra ewes: a field assay.

**Theriogenology**, v. 63, n. 4, p. 1235–1247, 2005.

BERGSTEIN, T. G.; WEISS, R. R.; BICUDO, S. D. Técnicas de análise de sêmen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 38, n. 4, p. 189–194, 2014.

BERTOL, M. A. F.; WEISS, R. R.; KOZICKI, L. E.; et al. In vitro and in vivo fertilization potential of cryopreserved spermatozoa from bull epididymides stored for up to 30 hours at ambient temperature (18 °C–20 °C). **Theriogenology**, v. 86, n. 4, p. 1014–1021, 2016.

BLASH, S.; MELICAN, D.; GAVIN, W. Cryopreservation of epididymal sperm obtained at necropsy from goats. **Theriogenology**, v. 54, n. 6, p. 899–905, 2000.

Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X00004003>>. Acesso em: 3/2/2016.

CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; et al. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. **Animal reproduction science**, v. 104, n. 2–4, p. 119–131, 2008.

Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432007000413>>. Acesso em: 5/5/2016.

COX, J. F.; ALFARO, V.; MONTENEGRO, V.; et al. Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus.

**Theriogenology**, v. 66, n. 4, p. 860–867, 2006.

CSEH, S.; FAIGL, V.; AMIRIDIS, G. S. Semen processing and artificial insemination in health management of small ruminants. **Animal Reproduction Science**, v. 130, n. 3–4, p. 187–192, 2012. Elsevier B.V. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.01.014>>. .

DOMÍNGUEZ, M. P.; FALCINELLI, A.; HOZBOR, F.; et al. Seasonal variations in the composition of ram seminal plasma and its effect on frozen-thawed ram sperm.

**Theriogenology**, v. 69, n. 5, p. 564–573, 2008. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X07006498>>. Acesso em: 15/2/2016.

DOTT, H. M.; HARRISON, R. A.; FOSTER, G. C. The maintenance of motility and the surface properties of epididymal spermatozoa from bull, rabbit and ram in homologous seminal and epididymal plasma. **Journal of reproduction and fertility**, v. 55, p. 113–124, 1979.

EHLING, C.; RATH, D.; STRUCKMANN, C.; et al. Utilization of frozen-thawed epididymal ram semen to preserve genetic diversity in Scrapie susceptible sheep breeds. **Theriogenology**, v. 66, n. 9, p. 2160–2164, 2006.

EL-HAJJ GHAOUI, R.; THOMSON, P. C.; LEAHY, T.; et al. Autologous whole ram seminal plasma and its vesicle-free fraction improve motility characteristics and membrane status but not in vivo fertility of frozen-thawed ram spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, n. 5, p. 541–549, 2007.

FREITAS-DELL'AQUA, C. P.; GUAISTI, P. N.; MONTEIRO, G. A.; et al. Flow cytometric analysis of fertile and subfertile frozen stallion spermatozoa. **Animal Reproduction**, v. 9, p. 941, 2012.

FRÉOUR, T.; JEAN, M.; MIRALLIÉ, S.; et al. Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA) parameters and their evolution during preparation as predictors of pregnancy in intrauterine insemination with frozen-thawed donor semen cycles. **European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology**, v. 149, n. 2, p. 186–189, 2010.

GAÑÁN, N.; GOMENDIO, M.; ROLDAN, E. R. S. Effect of storage of domestic cat (*Felis catus*) epididymides at 5°C on sperm quality and cryopreservation. **Theriogenology**, v. 72, n. 9, p. 1268–1277, 2009.

GRAHAM, J. K. Effect of seminal plasma on the motility of epididymal and ejaculated spermatozoa of the ram and bull during the cryopreservation process. **Theriogenology**, v. 41, n. 5, p. 1151–1162, 1994.

HALLAP, T.; NAGY, S.; JAAKMA, Ü.; et al. Usefulness of a triple fluorochrome combination Merocyanine 540/Yo-Pro 1/Hoechst 33342 in assessing membrane stability of viable frozen-thawed spermatozoa from Estonian Holstein AI bulls. **Theriogenology**, v. 65, n. 6, p. 1122–1136, 2006.

KAABI, M.; PAZ, P.; ALVAREZ, M.; et al. Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. **Theriogenology**, v. 60, p. 1249–1259, 2003.

LEAHY, T.; MARTI, J. I.; EVANS, G.; et al. Seasonal variation in the protective effect of seminal plasma on frozen–thawed ram spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 119, n. 1–2, p. 147–153, 2010. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432009003029>>. Acesso em: 22/9/2016.

LONE, F. A.; ISLAM, R.; KHAN, M. Z.; et al. Effect of transportation temperature on the quality of cauda epididymal spermatozoa of ram. **Animal reproduction science**, v. 123, n. 1–2, p. 54–59, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432010004471>>. Acesso em: 2/6/2016.

LÓPEZ-PÉREZ, A.; PÉREZ-CLARIGET, R. Ram seminal plasma improves pregnancy rates in ewes cervically inseminated with ram semen stored at 5 °C for 24 hours. **Theriogenology**, v. 77, n. 2, p. 395–399, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X11004171>>. Acesso em: 5/2/2016.

MARCO-JIMÉNEZ, F.; VICENTE, J. S.; VIUDES-DE-CASTRO, M. P. Seminal

Plasma Composition from Ejaculates Collected by Artificial Vagina and Electroejaculation in Guirra Ram. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, n. 4, p. 403–408, 2008.

MARTÍNEZ-PASTOR, F.; ANEL, L.; GUERRA, C.; et al. Seminal plasma improves cryopreservation of Iberian red deer epididymal sperm. **Theriogenology**, v. 66, n. 8, p. 1847–1856, 2006. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X0600286X>>. Acesso em: 22/9/2016.

MARTINEZ-PASTOR, F.; GARCIA-MACIAS, V.; ALVAREZ, M.; et al. Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer. **Theriogenology**, v. 65, n. 3, p. 471–485, 2006.

MARTINEZ-PASTOR, F.; GUERRA, C.; KAABI, M.; et al. Decay of sperm obtained from epididymes of wild ruminants depending on postmortem time. **Theriogenology**, v. 63, n. 1, p. 24–40, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X04001037>>. Acesso em: 27/5/2016.

MARTÍNEZ, A. F.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; ÁLVAREZ, M.; et al. Sperm parameters on Iberian red deer: Electroejaculation and post-mortem collection. **Theriogenology**, v. 70, n. 2, p. 216–226, 2008.

MARTINS, C. F.; DRIESSEN, K.; COSTA, P. M.; et al. 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, n. 1, p. 50–57, 2009.

MARTINS, K. R.; GHELLER, S. S. M.; FERREIRA, C. E. R.; et al. Post-thawing quality of ram spermatozoa is impaired by inclusion of boar seminal plasma in the freezing extender. **Small Ruminant Research**, 2016.

MATA-CAMPUZANO, M.; SOLEILHAVOUP, C.; TSIKIS, G.; et al. Motility of liquid stored ram spermatozoa is altered by dilution rate independent of seminal plasma concentration. **Animal reproduction science**, v. 162, p. 31–6, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432015300154>>. Acesso em: 11/1/2016.

MOCÉ, E.; GRAHAM, J. K. In vitro evaluation of sperm quality. **Animal Reproduction Science**, v. 105, n. 1–2, p. 104–118, 2008.

MONTEIRO, G. A.; GUASTI, P. N.; ROCHA, A. S.; et al. Effect of Storage Time and Temperature of Equine Epididymis on the Viability, Motion Parameters, and Freezability of Epididymal Sperm. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, n. 3, p. 169–173, 2013. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2012.06.010>>. .

MONTEIRO, G. A.; PAPA, F. O.; ZAHN, F. S.; et al. Cryopreservation and fertility of ejaculated and epididymal stallion sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 127, n. 3–4, p. 197–201, 2011.

NICHI, M.; RIJSSELAERE, T.; LOSANO, J.; et al. Evaluation of epididymis storage temperature and cryopreservation conditions for improved mitochondrial membrane potential, membrane integrity, sperm motility and in vitro fertilization in bovine

epididymal sperm. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 7, 2016.

O'MEARA, C. M.; DONOVAN, A.; HANRAHAN, J. P.; et al. Resuspending ram spermatozoa in seminal plasma after cryopreservation does not improve pregnancy rate in cervically inseminated ewes. **Theriogenology**, v. 67, n. 7, p. 1262–1268, 2007.

O'MEARA, C. M.; HANRAHAN, J. P.; PRATHALINGAM, N. S.; et al. Relationship between in vitro sperm functional tests and in vivo fertility of rams following cervical artificial insemination of ewes with frozen-thawed semen. **Theriogenology**, v. 69, n. 4, p. 513–522, 2008.

OKAZAKI, T.; AKIYOSHI, T.; KAN, M.; et al. Artificial Insemination With Seminal Plasma Improves the Reproductive Performance of Frozen-Thawed Boar Epididymal Spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 33, n. 5, p. 990–998, 2012.

RICKARD, J. P.; SCHMIDT, R. E.; MADDISON, J. W.; et al. Variation in seminal plasma alters the ability of ram spermatozoa to survive cryopreservation. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 28, n. 4, p. 516, 2016. Disponível em: <<http://www.publish.csiro.au/?paper=RD14123>>. Acesso em: 22/9/2016.

RODELLO, L.; BICUDO, S. D.; FALLEIROS, M. B.; et al. Implicações da redução na concentração de gema de ovo no meio glicina-gema-leite sobre a cinética, morfologia e integridade de membranas espermáticas em sêmen ovino criopreservado. **Veterinária e Zootecnia**, v. 18, n. 2, p. 239–248, 2011.

SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. **Animal Reproduction Science**, v. 38, n. 1–2, p. 1–36, 1995.

SONGSASEN, N.; TONG, J.; LEIBO, S. Birth of live mice derived by in vitro fertilization with spermatozoa retrieved up to twenty-four hours after death. **J Exp Zool**, v. 280, n. 2, p. 189–196, 1998.

STECKLER, D.; STOUT, T. A. E.; DURANDT, C.; et al. O. Validation of merocyanine 540 staining as a technique for assessing capacitation-related membrane destabilization of fresh dog sperm. **Theriogenology**, v. 83, n. 9, p. 1451–1460, 2015. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.01.019>>. .

TAMAYO-CANUL, J.; ALVAREZ, M.; LÓPEZ-URUEÑA, E.; et al. Undiluted or extended storage of ram epididymal spermatozoa as alternatives to refrigerating the whole epididymes. **Animal reproduction science**, v. 126, n. 1–2, p. 76–82, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432011001175>>. Acesso em: 1/2/2016.

TITTARELLI, C. M.; JURADO, S. B.; NUÑEZ-FAVRE, R.; et al. Effect of Storage Media and Storage Time on Histological and Ultrastructural Changes in Cat Epididymal Cells. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. SUPPL. 6, p. 281–283, 2012.

TITTARELLI, C.; SAVIGNONE, C. A.; ARNAUDÍN, E.; et al. Effect of storage media and storage time on survival of spermatozoa recovered from canine and feline epididymides. **Theriogenology**, v. 66, n. 6–7, p. 1637–1640, 2006. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X06000367>>. Acesso em: 13/11/2015.

VÁSQUEZ, J.; FLORENTINI, E. A.; CAMARGO, L. A.; et al. Hypoosmotic swelling test in epididymal ram (*Ovis aries*) spermatozoa. **Livestock Science**, v. 157, n. 2–3, p. 618–622, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S187114131300396X>>. Acesso em: 11/12/2015.

VÁSQUEZ, J. H.; NÚÑEZ, V. H.; FLORENTINI, E. A.; et al. Effects of five cryoprotective agents on quality of sheep epididymal spermatozoa during pre-freezing. **Livestock Science**, v. 152, n. 1, p. 94–99, 2013.

VIEIRA, L. A.; GADEA, J.; GARCÍA-VÁZQUEZ, F. A.; et al. Equine spermatozoa stored in the epididymis for up to 96 h at 4°C can be successfully cryopreserved and maintain their fertilization capacity. **Animal Reproduction Science**, v. 136, n. 4, p. 280–288, 2013.

WAY, A. M. Y. L.; GRIEL JR., L. C.; KILLIAN, G. J. Effects of accessory sex gland fluid on viability, capacitation, and acrosome reaction of cauda epididymal bull spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 2, p. 213–219, 2000.

## ARTIGO III

### SUBPOPULAÇÕES ESPERMÁTICAS DE ESPERMATOZOIDES RECUPERADOS DE EPIDÍDIMOS DE CARNEIROS ATÉ 48 HORAS APÓS A MORTE.

*Sperm subpopulations of spermatozoa recovered from ovine epididymes up to 48 hours after death.*

#### RESUMO

O objetivo deste estudo foi identificar subpopulações espermáticas com base na cinética de espermatozoides epididimários de ovinos e avaliar o efeito do período *post mortem* e da adição de 20% de plasma seminal ao meio diluidor para congelação sobre a porcentagem das subpopulações espermáticas nas amostras descongeladas. Além de correlacionar a porcentagem destas subpopulações com a taxa de gestação após inseminação artificial intrauterina em ovelhas. A análise de subpopulações foi baseada na cinética espermática obtida por Análise Espermática Assistida por Computador (CASA). Foram identificadas três subpopulações distintas nas amostras descongeladas do ejaculado ovino coletado em vagina artificial (AV) e espermatozoides ovinos recuperados da cauda de epidídimos. A Subpopulação 1 (SP1) foi caracterizada por espermatozoides lentos e não retilíneos, a subpopulação 2 (SP2) foi qualificada como espermatozoides hiperativados e a Subpopulação 3 (SP3) foi composta por espermatozoides rápidos e retilíneos. A SP1 foi a subpopulação mais frequente em todos os grupos estudados. O sêmen coletado em vagina artificial apresenta maior ( $P < 0,05$ ) porcentagem da SP2 e menor ( $P < 0,05$ ) porcentagem da SP1 quando comparado aos espermatozoides recuperados após a morte. O período pós-morte teve efeito negativo sobre as amostras espermáticas, aumentado ( $P < 0,05$ ) a porcentagem da SP1 e diminuindo ( $P < 0,05$ ) a SP2. O período após a morte foi a única variável que influenciou, de forma inversamente proporcional, à SP3. A SP3 desapareceu 48 horas após a morte. O plasma seminal diminuiu ( $P < 0,05$ ) a subpopulação caracterizada por espermatozoides hiperativados (SP2). Concluímos que os espermatozoides obtidos da cauda de epidídimo e o sêmen

coletado em AV apresentam três subpopulações espermáticas, após a descongelação, e que a porcentagem destas subpopulações varia conforme o período pós-morte e a presença de 20% de plasma seminal no meio diluidor. Todavia, concluímos que estas subpopulações não apresentam correlação com a fertilidade após AI intrauterina nas condições deste estudo.

## 1. Introdução

A recuperação de espermatozoides após a morte pode ser a última chance de preservar o material genético de reprodutores de interesse zootécnico quando vão a óbito inesperadamente (García-Álvarez et al., 2009) ou na formação de bancos de germoplasma de espécies ameaçadas de extinção (Martinez-Pastor et al., 2006a). A colheita de espermatozoides viáveis da cauda de epidídimos foi relatada em diversas espécies (Kaabi et al., 2003; Weiss et al., 2008; Koziol e Kozirowski, 2015; Bertol et al., 2016). Entretanto, fatores como o tempo entre a morte e a recuperação espermática (Kaabi et al., 2003), a temperatura de armazenagem dos epidídimos (Monteiro et al., 2013) e os diluidores utilizados na criopreservação (Tamayo-Canul et al., 2011) afetam a qualidade e fertilidade pós-descongelação dos espermatozoides recuperados da cauda de epidídimo.

O plasma seminal é a secreção das glândulas anexas do trato reprodutivo masculino e se mistura aos espermatozoides no momento da ejaculação. Espermatozoides recuperados de epidídimos não têm contato com o plasma seminal. A exposição *in vitro* de espermatozoides epididimários ao plasma seminal têm resultados contraditórios, enquanto alguns autores relatam o aumento da viabilidade após criopreservação (Martínez-Pastor et al., 2006a; Martínez-Pastor et al., 2006b; Rickard et al., 2014), outros autores identificaram efeito prejudicial à sobrevivência espermática em cães, ovinos, bovinos e búfalos (Dott et al., 1979; Herold et al., 2004).

O CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*) é um sistema computadorizado e automático de captura e análise de sucessivas fotos dos espermatozoides que, quando unidas, formam um filme com o trajeto de cada célula (Bergstein et al., 2014). Por esse sistema é possível obter informações precisas e acuradas do movimento de

cada célula espermática (Amann e Waberski, 2014). A análise multivariada dos parâmetros cinéticos individualizados permite o agrupamento dos espermatozoides de uma amostra em subpopulações com padrões de movimento similares. Poucos estudos utilizam a análise multivariada para identificação de subpopulações, sendo que informações relevantes na identificação de potencial fertilizante são subutilizada (Abaigar et al., 1999; Martínez-Pastor et al., 2011).

O objetivo deste estudo foi identificar subpopulações espermáticas com base na cinética de espermatozoides ovinos recuperados da cauda de epidídimos e avaliar o efeito do período *post mortem* e da adição de 20% de plasma seminal ao meio diluidor para congelação sobre a porcentagem de subpopulações espermáticas das amostras descongeladas, além de correlacionar a porcentagem destas subpopulações com a taxa de gestação após inseminação artificial intrauterina em ovelhas.

## 2. Material e métodos

### 2.1. Projeto do experimento

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Campus de Ciência Agrárias da Universidade Federal do Paraná, protocolo número 052/2016.

Foram utilizados 10 carneiros sem raça definida com idade entre 1 e 2 anos. Os animais permaneceram em sistema intensivo, com acesso à pastagem de campo nativo durante o dia e confinados no período da noite. Recebiam suplementação alimentar com milho, farelo de soja e mistura de minerais. O fornecimento de água foi *ad libitum*.

Com o uso de uma ovelha como manequim, a coleta do sêmen foi realizada pelo método de vagina artificial (AV). A temperatura interna final da AV foi de 40°C a 43°C. As coletas em AV foram realizadas duas vezes por semana, durante o período de dois meses, fora da estação reprodutiva (janeiro e fevereiro), e, posteriormente, esses animais foram encaminhados para o abate. Após o abate, um corte transversal foi realizado na região do funículo espermático para excisão do escroto contendo

testículos e epidídimos. As peças anatômicas foram transportadas ao laboratório, em no máximo uma hora, em caixa de isopor à temperatura ambiente (15-25°C).

Os epidídimos foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos, correspondentes ao período de exposição das peças anatômicas à temperatura ambiente: zero horas (G0), seis horas (G6), doze horas (G12), vinte e quatro horas (G24) e quarenta e oito horas (G48). Cada grupo foi constituído de quatro epidídimos, provenientes de quatro carneiros distintos.

## 2.2. Coleta dos espermatozoides da cauda de epidídimo

No laboratório, com lâmina de bisturi, foi realizada a incisão na pele do escroto para excisão dos testículos e epidídimos (Vásquez et al., 2013). Os testículos e epidídimos foram lavados com solução de cloreto de sódio a 0,09% aquecido a 35°C, em seguida, a secção da região de junção entre corpo e cauda dos epidídimos foi realizada. As caudas dos epidídimos foram alocadas em placas de Petri aquecidas e mantidas a 35°C. Utilizando pinça anatômica, tesouras e lâmina de bisturi, os vasos sanguíneos superficiais e aparentes foram dissecados e perfurados para evitar a contaminação dos espermatozoides com o sangue. Na sequência, foram realizados cortes transversais e leve pressão sobre a cauda de epidídimo para que os espermatozoides contidos nos túbulos fossem removidos (Kaabi et al. 2003) em 2mL do CM aquecido a 35°C. Após cinco minutos, os espermatozoides diluídos foram pipetados da placa de Petri em tubo cônico (BD Falcon) (Martinez-Pastor et al. 2006b).

## 2.3. Criopreservação

O meio controle (CM) usado na criopreservação foi constituído de 75mL de solução mãe (200mL água destilada, 1,4g glicina, 2,97g citrato de sódio, 3g frutose, 0,004g amicacina), 15mL de leite desnatado a 11%, 5g gema de ovo e 4,6 mL de água destilada e 4% de glicerol (Rodello et al., 2011). No CM foi adicionado 20% de plasma seminal para constituir o meio SP. O plasma seminal foi proveniente dos mesmos

carneiros utilizados na coleta de sêmen com vagina artificial durante o verão (janeiro e fevereiro). A obtenção do plasma seminal e produção do meio diluidor com plasma seminal seguiu a metodologia de López-Pérez e Pérez-Clariget (2012).

A diluição das doses com os meios CM e SP foi realizada a fim de obter a concentração final de 400 milhões de espermatozoides totais por mL. As doses foram envasadas em palhetas francesas com volume de 0,25mL e 100 milhões de espermatozoides totais por dose. As doses foram congeladas em equipamento automatizado (TK 3000<sup>®</sup>, TK Congelações, Brasil), com curva padrão para congelamento de sêmen ovino "S2P3", que decresce da temperatura ambiente até 5°C na razão de 0,5°C por minuto. As doses foram estabilizadas em 5°C por duas horas, e, em seguida, a temperatura voltava a cair 15°C por minuto até atingir -80°C, na razão de 10°C por minuto até -120°C. Neste momento, as palhetas foram submersas em nitrogênio líquido. As amostras foram descongeladas em banho-maria a 40°C por 20 segundos. Os parâmetros espermáticos foram avaliados imediatamente após a descongelação.

#### 2.4. Análise de Cinética Espermática Assistida por Computador

A Análise de Cinética Espermática Assistida por Computador (CASA) foi realizada em equipamento Hamilton Thorn Motility Analyser – HTMA –IVOS 12 – Hamilton Research – Beverly, MA, USA. Para avaliação da cinética espermática, 30µL do sêmen congelado/descongelado foi diluído em 300µL de CM previamente aquecido e mantido a 37°C. O volume de 6µL do sêmen diluído foi depositado na câmara de Makler (Makler Counting Chamber – Selfi-Medical, Haifa, Israel). Aleatoriamente, três campos da câmara foram escolhidos e os valores individuais de cada espermatozoide presente nos campos foram analisados para motilidade total (%), motilidade progressiva (%), velocidade de trajeto (VAP, µm/s), velocidade progressiva (VSL, m/s), velocidade curvilínea (VCL, µm/s), amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH, µm), frequência de batimentos do flagelo (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %) e linearidade (LIN, %). Os dados individuais foram salvos em planilhas para análise estatística posterior. O *setup* utilizado foi baseado nas indicações do fabricante obtidas por meio do manual de uso do equipamento (HAMILTON THORNE SETUP

FOR IVOS-12.3), sendo que o tamanho da célula foi de 5 pixels, intensidade da célula 55, VAP 75  $\mu/s$ , STR 80%, VAP *cutoff* 21,9  $\mu/s$ , VSL *cutoff* 6,0  $\mu/s$ , intensidade de estáticos mínimo 0,25 e máximo 1,5, tamanho de estáticos mínimo 0,6 e máximo 8,0 e alongação de estáticos mínimo 0 e máximo 95. A magnificação foi de 1,95, frequência de vídeo 60 Hz, intensidade de iluminação 2400, fotômetro baixo 73 e alto 125.

## 2.5. Inseminação artificial

Cem ovelhas (idade entre 9 e 36 meses), sem raça definida, foram submetidas ao protocolo de sincronização de estro com implante intravaginal impregnado com 60mg de acetato de medroxiprogesterona (Progespon<sup>®</sup>, Zoetis, Estados Unidos), pelo período de 14 dias, ao final da estação reprodutiva (julho). Cinco ovelhas perderam os implantes e foram excluídas do experimento antes da inseminação artificial. No dia da retirada do implante, foi administrado 500UI de eCG (Novormon<sup>®</sup>, Zoetis, Estados Unidos) (Anel et al., 2005). As ovelhas foram distribuídas aleatoriamente nos grupos (AV, G0, G6, G12, G24, CM e SP). As amostras do G48 não foram utilizadas na inseminação artificial por apresentarem valores muito baixo de TM e PM. A dose inseminante foi de 100 milhões de espermatozoides totais.

A inseminação artificial (AI) foi realizada entre 50 e 56 horas após a retirada do implante intravaginal de progesterona. Após jejum sólido e líquido de doze horas, as ovelhas foram sedadas com 0,05mL/Kg de acepromazina e contidas em macas na posição de Trendelenburg. Os cornos uterinos foram observados com a óptica laparoscópica de 5mm e 30° de angulação (Karl Stroz, Tuttlingen, German). As doses inseminantes foram depositadas na luz dos cornos uterinos, na região média da curvatura maior de cada corno, utilizando uma pipeta de Robertson (Minitube Brasil, Porto Alegre, Brasil) (Anakkul et al., 2014). O diagnóstico ultrassonográfico de gestação foi realizado pela via transabdominal aos 60 dias após a AI com probe linear de 5mHz (DP2200 VET, Mindray Medical International Limited, Shenzhen, China).

## 2.6. Estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas no software JMP versão 5.0.1(SAS Institute Inc, Cary, Carolina do Norte, Estados Unidos da América).

A análise estatística para identificação das subpopulações seguiu a metodologia de Martinez-Pastor et al. (2005b). Primeiramente, os dados das avaliações cinéticas individuais dos espermatozoides foram avaliados em um procedimento de componentes principais afim de diminuir as variáveis iniciais ao menor número possível de componentes mantendo o maior número de informações possíveis. Essa análise permite sumarizar muitas variáveis em um número menor de componentes não correlacionados. Os componentes principais selecionados para seguir a análise foram aqueles que obtiveram variância maior que um (critério de Kaiser). Em seguida foi realizada uma análise não hierárquica (*k-means*) com 15 clusters, utilizando os componentes principais identificados na análise anterior como variáveis. A terceira etapa da análise de agrupamentos foi o teste hierárquico utilizando o método de ligação média para unir os clusters obtidos na análise *k-means*. Para identificar o número final de subpopulações, os dados de distância entre clusters foram plotados e o aumento abrupto das distâncias foi identificado na ligação referente a 3 subpopulações (Martinez-Pastor et al., 2005b; Martínez-Pastor et al., 2011).

O teste de Qui-quadrado foi utilizado para identificar diferenças na porcentagem de cada subpopulação nos grupos (AV, G0, G6, G12, G24, G48, CM e SP). A matriz de correlação de Pearson foi utilizada para identificar a correlação entre a fertilidade e as subpopulações em cada grupo. O nível de significância foi de 5% em todos os testes estatísticos.

### 3. Resultados

Os resultados da análise de componentes principais estão descritos na Tabela 1. Os componentes principais 1 (PC1) e 2 (PC2) apresentaram variância de 3,7 e 1,9 respectivamente, e foram selecionados para prosseguirem à Analise não Hierárquica. Os componentes principais selecionados correspondem a 80,1% das informações originais (Tabela 1). Com base nos valores dos autovetores é possível identificar que

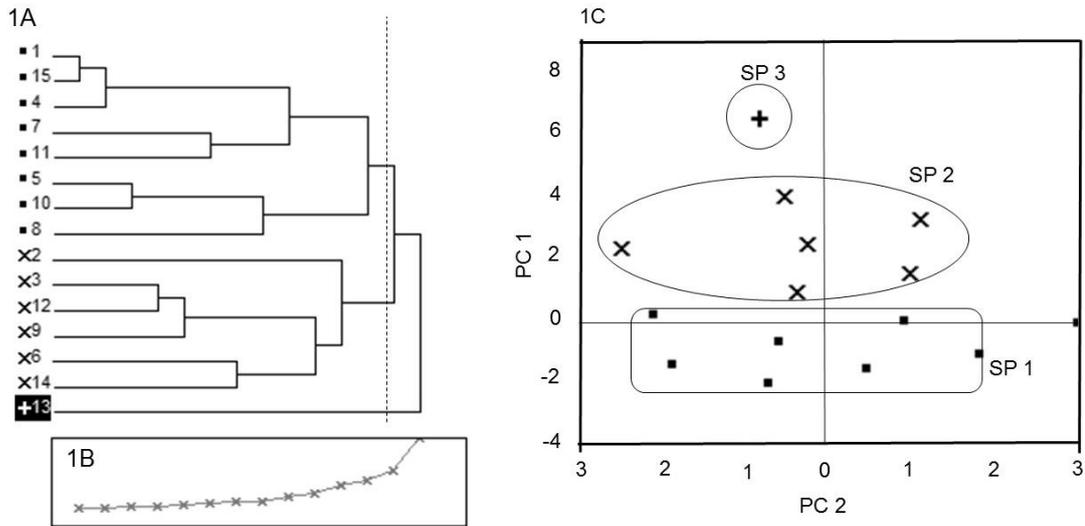
o PC1 está relacionado a altos VAP, VSL e VCL, enquanto o PC2 está relacionado à STR e LIN.

TABELA 1. VARIÂNCIA, PORCENTAGEM DE DADOS (%), PORCENTAGEM DE DADOS ACUMULADA (%) E AUTOVETORES IDENTIFICADOS NA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS DA VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, STR, LIN.

	PC 1	PC 2	PC 3	PC 4	PC 5	PC 6	PC 7
Variância	3,7	1,9	0,9	0,3	0,2	0,1	0,0
Porcentagem de dados	52,9	27,2	12,8	3,9	2,2	0,7	0,3
Porcentagem acumulada	52,9	80,1	92,9	96,8	99,0	99,7	100,0
Autovetores							
VAP	0,4933	-0,1557	-0,0399	-0,3479	0,1938	0,1819	0,7343
VSL	0,4989	0,0452	0,1256	-0,3349	-0,0614	-0,7345	-0,2792
VCL	0,4631	-0,2946	0,0137	-0,1419	-0,2900	0,5805	-0,5073
ALH	0,3524	-0,4343	-0,0875	0,7818	0,1786	-0,1875	0,0362
BCF	-0,1323	-0,2748	0,9380	-0,0158	0,1575	0,0389	0,0230
STR	0,2725	0,5415	0,2941	0,3499	-0,5954	0,0618	0,2554
LIN	0,2783	0,5741	0,0918	0,1130	0,6807	0,2235	-0,2418

O dendograma da análise hierárquica está demonstrado na Figura 1A. A análise da distância entre *clusters*, plotada no gráfico 1B, foi utilizada para identificar o número ideal de subpopulações, demonstrada na figura 1A pela linha tracejada. Foram identificadas três subpopulações espermáticas nas amostras de sêmen colhido em vagina artificial e nos espermatozoides recuperados de epidídimos ovinos mantidos à temperatura ambiente até 48 horas após a morte. A delimitação das três subpopulações está demonstrada no espaço multidimensional do PC1 e PC2 na Figura 1C.

FIGURA 1. ANÁLISE HIERÁRQUICA, GRÁFICO DA DISTÂNCIA ENTRE CLUSTERS E DELIMITAÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES.



1.A. Dendrograma da análise hierárquica. A linha tracejada demarca a posição de corte para obtenção das subpopulações. 1.B. Gráfico da distância entre cluster. O corte do histograma foi realizado na região que referencia o aumento exponencial da distância entre os clusters (linha tracejada). 1.C. O círculo, a elipse e o retângulo demarcam as três subpopulações identificadas após análise hierárquica no espaço multidimensional definido pelos dois componentes principais extraídos da análise de componentes principais (PC1 e PC2).

- SP1: subpopulação 1
- X SP2: subpopulação 2
- + SP3: subpopulação 3

Na tabela 1, estão descritos os parâmetros cinéticos das três subpopulações identificadas no sêmen descongelado colhido em vagina artificial e espermatozoides recuperados da cauda de epidídimos de carneiros. Os parâmetros cinéticos diferem ( $P < 0,05$ ) entre as subpopulações, com exceção do BCF no SP2 e SP3.

TABELA 2. MÉDIA  $\pm$  DESVIO PADRÃO DA VAP( $\mu\text{M/S}$ ), VSL(M/S), VCL( $\mu\text{M/S}$ ), ALH( $\mu\text{M}$ ), BCF(HZ), STR (%) E LIN (%) DAS SUBPOPULAÇÕES 1(SP1), 2(SP2) E 3(SP3) IDENTIFICADAS NA ANÁLISE MULTIVARIADA DO SÊMEN OVINO COLHIDO EM VAGINA ARTIFICIAL E ESPERMATOZOÍDES OVINOS RECUPERADOS DA CAUDA DE EPIDÍDIMO ATÉ 48 HORAS APÓS A MORTE.

	SP1	SP2	SP3
VAP	28,5 $\pm$ 16,7 <sup>c</sup>	133,3 $\pm$ 39,0 <sup>a</sup>	93,5 $\pm$ 28,5 <sup>b</sup>
VSL	16,3 $\pm$ 11,9 <sup>c</sup>	94,1 $\pm$ 45,6 <sup>a</sup>	81,5 $\pm$ 28,2 <sup>b</sup>
VCL	70,2 $\pm$ 40,1 <sup>c</sup>	266,0 $\pm$ 56,3 <sup>a</sup>	175,8 $\pm$ 47,4 <sup>b</sup>
ALH	3,9 $\pm$ 2,5 <sup>c</sup>	11,1 $\pm$ 3,1 <sup>a</sup>	6,8 $\pm$ 2,0 <sup>b</sup>
BCF	40,0 $\pm$ 17,6 <sup>a</sup>	34,5 $\pm$ 14,6 <sup>b</sup>	34,1 $\pm$ 14,7 <sup>b</sup>
STR	59,2 $\pm$ 24,6 <sup>c</sup>	69,0 $\pm$ 23,1 <sup>b</sup>	86,7 $\pm$ 9,6 <sup>a</sup>
LIN	27,3 $\pm$ 18,9 <sup>c</sup>	34,5 $\pm$ 13,6 <sup>b</sup>	47,2 $\pm$ 12,1 <sup>a</sup>

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre os resultados

A Subpopulação 1 (SP1) representa espermatozoides lentos (baixos valores de VAP, VSL e VCL) e não lineares, porém, com alta atividade flagelar (BCF). Provavelmente o SP1 foi formado por espermatozoides de movimento circular, pois percorreram um trajeto curto (VSL). A Subpopulação 2 (SP2) é formada por espermatozoides rápidos (maiores valores de VAP, VSL e VCL), altos valores de ALH e valores médios de STR e LIN. A Subpopulação 3 (SP3) é caracterizada por espermatozoides com velocidades altas, baixo ALH e altos STR e LIN, sendo classificados como espermatozoides rápidos e retilíneos.

A porcentagem de cada subpopulação entre os grupos estudados (AV, G0, G6, G12, G24, G48, CM e SP) está descrita na Tabela 3.

TABELA 2. PORCENTAGEM (%) DAS SUBPOPULAÇÕES 1 (SP1), 2 (SP2) e 3 (SP3) APÓS DESCONGELAÇÃO DO SÊMEN OVINO COLHIDO EM VAGINA ARTIFICIAL (AV) E ESPERMATOZÓIDES RECUPERADOS DA CAUDA DE EPIDÍDIMOS MANTIDOS À TEMPERATURA AMBIENTE POR 0(G0), 6(G6), 12 (G12), 24(G24), 48(G48) HORAS APÓS A MORTE E CRIOPRESERVADAS EM MEIO CONTROLE (CM) E MEIO CONTROLE COM ADIÇÃO DE 20% DE PLASMA SEMINAL (SP).

Diluidor	Grupo	SP1	SP2	SP3
Meio Controle	AVCM	40,8 <sup>e</sup>	32,3 <sup>a</sup>	26,9 <sup>ab</sup>
	G0CM	51,6 <sup>d</sup>	20,8 <sup>b</sup>	27,5 <sup>a</sup>
	G6CM	65,6 <sup>c</sup>	10,9 <sup>cd</sup>	23,5 <sup>ab</sup>
	G12CM	75,0 <sup>b</sup>	10,4 <sup>cd</sup>	14,5 <sup>de</sup>
	G24CM	74,4 <sup>b</sup>	9,8 <sup>cd</sup>	15,8 <sup>e</sup>
	G48CM	87,0 <sup>ab</sup>	12,9 <sup>c</sup>	0,0 <sup>f</sup>
Plasma seminal	AVSP	60,4 <sup>c</sup>	18,7 <sup>b</sup>	20,9 <sup>b</sup>
	G0SP	63,2 <sup>c</sup>	12,3 <sup>c</sup>	24,5 <sup>ab</sup>
	G6SP	62,0 <sup>c</sup>	13,2 <sup>c</sup>	24,8 <sup>ab</sup>
	G12SP	72,1 <sup>bc</sup>	8,3 <sup>cd</sup>	19,6 <sup>bcd</sup>
	G24SP	81,8 <sup>ab</sup>	6,1 <sup>d</sup>	12,1 <sup>e</sup>
	G48SP	99,5 <sup>a</sup>	0,5 <sup>e</sup>	0,0 <sup>f</sup>

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre os resultados.

Ao comparar o sêmen coletado em vagina artificial e os espermatozoides recuperados da cauda de epidídimo logo após a morte (G0), é possível identificar que a SP2 sofre influência do tipo de coleta. A porcentagem da SP2 no sêmen colhido em AV é maior ( $P < 0,05$ ) quando comparado ao G0 (CM:32,3 *versus* 20,8 e SP:18,7 *versus* 12,3). A porcentagem da SP1 no sêmen coletado em vagina artificial e congelado em CM é menor ( $P < 0,05$ ) que a porcentagem de SP1 no G0 (40,8<sup>e</sup> *versus* 51,6<sup>d</sup>).

Quando o efeito do período pós-morte foi avaliado pela porcentagem de subpopulações, foi possível identificar o aumento gradativo da SP1 em detrimento das subpopulações 2 e 3. O SP1 aumentou ( $P < 0,05$ ) 6 horas após a morte no grupo CM e 24 horas após a morte no grupo SP. A SP2 nas amostras criopreservadas em CM diminuiu 6 horas após a morte e, nas amostras congeladas em SP, diminuiu 24 horas *post mortem*. A SP3 diminuiu a partir de 12 horas pós-morte em ambos os meios diluidores.

Ao comparar os meios diluidores foi verificado que a SP1 é menos frequente no CM nos grupos AV e G0 quando comparado ao SP. A SP2 segue o padrão inverso de distribuição da SP1, sendo que a porcentagem da SP2 é maior ( $P < 0,05$ ) nos grupos AVCM e G0CM quando comparado às amostras criopreservadas no meio SP. A SP3 não foi influenciada pelo meio diluidor.

A fertilidade após AI não diferiu ( $P > 0,05$ ) entre a origem dos espermatozoides (AV ou *post mortem*), horas após a morte e meios diluidores utilizados. A taxa de gestação após AI com o sêmen coletado em vagina artificial e criopreservado em CM e SP foi de 15,4%. A taxa de gestação dos espermatozoides recuperados de epidídimo no G0 (CM:28,6%; SP:0,0%), G6 (CM e SP: 28,6%), G12 (CM:12,5%; SP:40,0%) e G24 (CM:0%, SP:30%) não diferiram ( $P > 0,05$ ) entre si. As correlações entre a fertilidade e a porcentagem da SP1 ( $R=0,091$ ;  $P=0,80$ ), SP 2 ( $R=-0,162$ ;  $P=0,65$ ), SP 3 ( $R=0,03$ ;  $P=0,93$ ) e SP2+SP3 ( $R=-0,276$ ;  $P=0,50$ ) não foram significativas.

#### 4. Discussão

O ejaculado ovino é composto por uma população heterogênea de células espermáticas (García-Álvarez et al., 2010; Bergstein et al., 2016). O uso dos valores médios de motilidade simplificam demasiadamente a análise da motilidade e consideram a amostra como sendo homogênea (Martinez-Pastor et al., 2005b; Contri et al., 2012). Por esse motivo, pesquisadores têm utilizado a análise multivariada para identificação de subpopulações espermáticas e a variação da porcentagem destas subpopulações em diversas etapas do processamento espermático (Abaigar et al., 1999; Dorado et al., 2011; Gallego et al., 2015).

O presente estudo identificou a presença de três subpopulações no sêmen ovino, resultados similares foram relatados Santolaria et al. (2015). A SP1 identificada neste estudo é caracterizada por espermatozoides lentos e não lineares e é relacionada a amostras de baixa qualidade (Martínez-Pastor et al., 2011). A SP2 foi formada por espermatozoides rápidos e com valores de STR e LIN médios, e representa células que estão em processo de hiperativação por apresentarem altos valores de VAP, BCF e ALH concomitantemente com baixos valores de LIN (Martinez-Pastor et al., 2005b). Segundo Colás et al. (2010), espermatozoides com LIN  $\leq 45\%$  e ALH  $\geq 3,5\mu\text{m}$  são classificados como hiperativados. A SP3 é formada por espermatozoides rápidos e retilíneos que correspondem a amostras seminais de boa qualidade (Martínez-Pastor et al., 2011). Até onde se sabe, este é o primeiro relato da identificação de subpopulações nos espermatozoides ovinos recuperados da cauda de epidídimos.

Os espermatozoides provenientes da cauda de epidídimo apresentam viabilidade e fertilidade similares ao sêmen colhido com vagina artificial (Álvarez et al., 2012), contudo, no presente estudo, foi possível identificar que o sêmen colhido em vagina artificial apresenta menores valores da SP1 (lentos e não lineares) e maiores valores da SP2 (rápidos e STR e LIN médios) quando comparado aos espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo imediatamente após a morte. Segundo Martinez-Pastor et al. (2005b) a subpopulação caracterizada por espermatozoides lentos e não lineares seria formada, principalmente, por espermatozoides que não tiveram sua maturação completa no epidídimo, explicando as diferenças encontradas entre as origens espermáticas (AV e *post mortem*). Contri et al. (2012) identificaram diferenças nos padrões subpopulacionais quando

compararam o sêmen felino coletado por eletroejaculação e da cauda de epidídimos após orquiectomia.

Os espermatozoides recuperados da cauda de epidídimo são afetados pelo período após a morte, principalmente quando são mantidos à temperatura ambiente. Nestas condições, a motilidade total e motilidade progressiva decresce a partir de 24 horas *post mortem* em ovinos (Kaabi et al., 2003). No presente estudo, foi possível identificar que o padrão de movimento das células espermáticas recuperadas da cauda de epidídimos mantidos à temperatura ambiente é alterado 6 horas após a morte, com o aumento da SP1 (lentos e não retilíneos) em detrimento da SP2 (rápidos e com LIN e STR médios) nas amostras criopreservadas com CM. Além disso, a subpopulação caracterizada por espermatozoides rápidos e retilíneos (SP3) diminuiu 12 horas após a morte, coincidindo com o início da degeneração dos tubos epididimários relatada por Songsasen et al. (1998). Desta forma, comprovamos que, ainda que a média da motilidade total e motilidade progressiva diminuam 24 horas após a morte, o efeito do tempo após a morte altera o padrão de movimento dos espermatozoides horas antes.

A SP3 (rápidos e lineares) foi afetada somente pelo período *post mortem*. Nos grupos G48 esta subpopulação desapareceu. A diminuição da SP3 coincidiu com o aumento considerável da SP1 (lentos e não lineares). Martinez-Pastor et al. (2005a) também identificaram decréscimo abrupto da subpopulação caracterizada por espermatozoides com velocidades médias e linearidade alta entre 48 e 72 horas após a morte nos espermatozoides recuperados de epidídimos de cervídeos. Os mesmos autores sugeriram que este é o limite de tempo em que seria possível recuperar espermatozoides do epidídimo. Os nossos achados corroboram esta hipótese. Contudo, quando os espermatozoides forem utilizados em técnicas reprodutivas que independam da motilidade (injeção intracitoplasmática) este não é um fator limitante.

As proteínas presentes no plasma seminal exercem funções moduladoras na motilidade, viabilidade e função espermática (Rodrigues et al., 2013; Soleilhavoup et al., 2014; Mehr et al., 2015). Autores relatam que o plasma seminal possui ação decapacitante sobre as células espermáticas (Ledesma et al., 2016). Capacitação é um termo coletivo para as mudanças que um espermatozoide sofre quando entra em contato com o trato reprodutivo feminino, e essas incluem a reorganização de

proteínas de membrana, o efluxo de colesterol da bicamada lipídica com consequente aumento da fluidez da membrana, a modulação da concentração iônica intracelular, o aumento da atividade da tirosina quinase e o desenvolvimento da motilidade hiperativada. A menor incidência da SP2 (espermatozoides hiperativados) nas amostras criopreservadas na presença de plasma seminal pode ser resultado da ação decapacitante das proteínas plasmáticas. Mortimer et al. (1998) relataram que a presença de plasma seminal no meio de capacitação inibe, de forma reversível, o desenvolvimento de motilidade hiperativada em humanos. A ação decapacitante do plasma seminal normalmente é relacionada a reversão de crioinjúrias e ao aumento do período de viabilidade das amostras espermáticas (López-Pérez e Pérez-Clariget, 2012). Entretanto, a maior porcentagem de SP1 nas amostras criopreservadas em SP nos leva a crer que o plasma seminal teve efeito depreciativo sobre a qualidade espermática, ainda que não tenha sido observada variação da fertilidade. Segundo Way et al. (2000), quando o macho ejacula no trato reprodutivo da fêmea, o muco cervical funciona como uma barreira ao plasma seminal, desta forma não é natural que os espermatozoides permaneçam por longos períodos em contato com o plasma seminal, e essa exposição prolongada pode promover efeitos negativos nas células espermáticas.

A taxa de gestação, após inseminação por laparoscopia, foi menor que a relatada por outros autores após inseminação com espermatozoides ovinos recuperados de epidídimos (Álvarez et al., 2012). A nossa hipótese é que o período tardio (final da estação reprodutiva) da inseminação artificial e o grande número de ovelhas jovens possam ter afetado esses resultados. A subpopulação formada por espermatozoides rápidos e lineares é, normalmente, relacionada a amostras de boa qualidade (Martínez-Pastor et al., 2011), contudo, no presente estudo, não identificamos valores significativos de correlação entre a SP3 e a fertilidade após IA intrauterina. Outros autores como (García-Álvarez et al., 2013) encontraram correlação significativa entre a subpopulação de espermatozoides hiperativados e fertilidade *in vitro*, entretanto, no presente trabalho, a correlação entre a SP2 e a IA também não foi significativa. Santolaria et al. (2015) também identificaram três subpopulações no ejaculado ovino e não encontraram correlação entre as subpopulações e fertilidade após IA cervical em ovinos. Alguns autores relatam que a fertilidade está mais relacionada a viabilidade espermática do que a parâmetros cinéticos (Santolaria et al., 2015).

#### 4.1. Conclusões

Foi possível caracterizar três subpopulações espermáticas com padrões de cinética espermáticas distintas no sêmen ovino e em espermatozoides ovinos recuperados da cauda de epidídimos. O sêmen coletado em vagina artificial apresenta maior porcentagem de células em estado de hiperativação quando comparado aos espermatozoides recuperados dos epidídimos. O período pós-morte apresenta efeito negativo sobre as subpopulações espermáticas, aumentando a porcentagem de subpopulações ligadas às amostras de má qualidade e diminuindo subpopulações desejáveis. A adição de plasma seminal ao meio diluidor para criopreservação não é indicada, pois diminuiu a subpopulação de espermatozoides hiperativados e aumentou a porcentagem da subpopulação caracterizada por espermatozoides lentos e não lineares. Não foi possível correlacionar as subpopulações com a fertilidade após inseminação artificial intrauterina.

#### Agradecimentos

T.G. Bergstein-Galan recebeu bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES (Brasil).

#### REFERÊNCIAS

ABAIGAR, T.; HOLT, W. V; HARRISON, R. A; et al. Sperm subpopulations in boar (*Sus scrofa*) and gazelle (*Gazella dama mhorr*) semen as revealed by pattern analysis of computer-assisted motility assessments. **Biology of reproduction**, v. 60, n. 1, p. 32–41, 1999.

ÁLVAREZ, M.; TAMAYO-CANUL, J.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, C.; et al. Specificity of the extender used for freezing ram sperm depends of the spermatozoa source (ejaculate, electroejaculate or epididymis). **Animal reproduction science**, v. 132, n. 3–4, p. 145–154, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432012001339>>. Acesso em: 1/2/2016.

AMANN, R. P.; WABERSKI, D. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 5–17, 2014. Elsevier Inc. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.004>>. .

ANAKKUL, N.; SUWIMONTEERABUTR, J.; THARASANIT, T.; et al. Sperm distribution and fertilization after unilateral and bilateral laparoscopic artificial insemination with frozen-thawed goat semen. **Theriogenology**, v. 82, n. 8, p. 1137–44, 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X14003987>>. Acesso em: 15/2/2016.

ANEL, L.; KAABI, M.; ABROUG, B.; et al. Factors influencing the success of vaginal and laparoscopic artificial insemination in churra ewes: a field assay. **Theriogenology**, v. 63, n. 4, p. 1235–1247, 2005.

BERGSTEIN, T. G.; BICUDO, L. C.; RODELLO, L.; et al. Kinematic and spermatid recovery after selection by centrifugation in colloid solutions of ovine cryopreserved semen □. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 6, p. 1539–1547, 2016.

BERGSTEIN, T. G.; WEISS, R. R.; BICUDO, S. D. Técnicas de análise de sêmen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 38, n. 4, p. 189–194, 2014.

BERTOL, M. A. F.; WEISS, R. R.; KOZICKI, L. E.; et al. In vitro and in vivo fertilization potential of cryopreserved spermatozoa from bull epididymides stored for up to 30 hours at ambient temperature (18 °C–20 °C). **Theriogenology**, v. 86, n. 4, p. 1014–1021, 2016.

COLÁS, C.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A.; MUIÑO-BLANCO, T. Caffeine induces ram sperm hyperactivation independent of cAMP-dependent protein kinase. **International Journal of Andrology**, v. 33, n. 1, 2010.

CONTRI, A.; ZAMBELLI, D.; FAUSTINI, M.; et al. Artificial neural networks for the definition of kinetic subpopulations in electroejaculated and epididymal spermatozoa in the domestic cat. **Reproduction**, v. 144, n. 3, p. 339–347, 2012.

DORADO, J.; ALCARÁZ, L.; DUARTE, N.; et al. Changes in the structures of motile sperm subpopulations in dog spermatozoa after both cryopreservation and centrifugation on PureSperm® gradient. **Animal Reproduction Science**, v. 125, n. 1–4, p. 211–218, 2011. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.03.013>>. .

DOTT, H. M.; HARRISON, R. A.; FOSTER, G. C. The maintenance of motility and the surface properties of epididymal spermatozoa from bull, rabbit and ram in homologous seminal and epididymal plasma. **Journal of reproduction and fertility**, v. 55, p. 113–124, 1979.

GALLEGO, V.; VÍLCHEZ, M. C.; PEÑARANDA, D. S.; et al. Subpopulation pattern of eel spermatozoa is affected by post-activation time, hormonal treatment and the thermal regimen. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 27, n. 3, p. 529, 2015. Disponível em: <<http://www.publish.csiro.au/?paper=RD13198>>. Acesso em: 22/9/2016.

GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A. RAMÓN, M.; et al. Dynamics of sperm subpopulations based on motility and plasma membrane status in thawed ram spermatozoa incubated under conditions that support in vitro capacitation and fertilization. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 26, n. 5, 2013.

GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; RAMÓN, M.; et al. Analysis of selected sperm by density gradient centrifugation might aid in the estimation of in vivo fertility of thawed ram spermatozoa. **Theriogenology**, v. 74, n. 6, p. 979–988, 2010. Elsevier Inc. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.04.027>>. .

GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; et al. Sperm characteristics and in vitro fertilization ability of thawed spermatozoa from Black Manchega ram: Electroejaculation and postmortem collection.

**Theriogenology**, v. 72, n. 2, p. 160–168, 2009.

HEROLD, F. .; AURICH, J. .; GERBER, D. Epididymal sperm from the African buffalo (*Syncerus caffer*) can be frozen successfully with AndroMed® and with Triladyl™ but the addition of bovine seminal plasma is detrimental. **Theriogenology**, v. 61, n. 4, p. 715–724, 2004.

KAABI, M.; PAZ, P.; ALVAREZ, M.; et al. Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. **Theriogenology**, v. 60, p. 1249–1259, 2003.

KOZIOŁ, K.; KOZIOROWSKI, M. Morphological defects of epididymal spermatozoa in male roe deer (*Capreolus capreolus*) during the reproductive season. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 18, n. 3, 2015. Disponível em:

<<http://www.degruyter.com/view/j/pjvs.2015.18.issue-3/pjvs-2015-0073/pjvs-2015-0073.xml>>. Acesso em: 22/9/2016.

LEDESMA, A.; FERNÁNDEZ-ALEGRE, E.; CANO, A.; et al. Seminal plasma proteins interacting with sperm surface revert capacitation indicators in frozen-thawed ram sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 173, p. 35–41, 2016.

LÓPEZ-PÉREZ, A.; PÉREZ-CLARIGET, R. Ram seminal plasma improves pregnancy rates in ewes cervically inseminated with ram semen stored at 5 °C for 24 hours. **Theriogenology**, v. 77, n. 2, p. 395–399, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X11004171>>. Acesso em: 5/2/2016.

MARTÍNEZ-PASTOR, F.; ANEL, L.; GUERRA, C.; et al. Seminal plasma improves cryopreservation of Iberian red deer epididymal sperm. **Theriogenology**, v. 66, n. 8, p. 1847–1856, 2006. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X0600286X>>. Acesso em: 22/9/2016.

MARTINEZ-PASTOR, F.; DIAZ-CORUJO, A. R.; ANEL, E.; et al. Post mortem time and season alter subpopulation characteristics of Iberian red deer epididymal sperm. **Theriogenology**, v. 64, n. 4, p. 958–974, 2005.

MARTINEZ-PASTOR, F.; GARCIA-MACIA, V.; ALVAREZ, M.; et al. Sperm Subpopulations in Iberian Red Deer Epididymal Sperm and Their Changes Through the Cryopreservation Process. **Biology of Reproduction**, v. 72, n. 2, p. 316–327, 2005. Disponível em:

<<http://www.biolreprod.org/cgi/doi/10.1095/biolreprod.104.032730>>. .

MARTINEZ-PASTOR, F.; GARCIA-MACIAS, V.; ALVAREZ, M.; et al. Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red

deer. **Theriogenology**, v. 65, n. 3, p. 471–485, 2006.

MARTÍNEZ-PASTOR, F.; TIZADO, E. J.; GARDE, J. J.; et al. Statistical Series: Opportunities and challenges of sperm motility subpopulation analysis. **Theriogenology**, v. 75, n. 5, p. 783–795, 2011.

MEHR, M. R.A.; MOUSAVI, M.; GHADAMYARI, M. Effect of seminal plasma proteins on membrane cholesterol efflux of ram epididymal spermatozoa. **Small Ruminant Research**, v. 129, p. 88–91, 2015.

MONTEIRO, G. A.; GUASTI, P. N.; ROCHA, A. S.; et al. Effect of Storage Time and Temperature of Equine Epididymis on the Viability, Motion Parameters, and Freezability of Epididymal Sperm. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, n. 3, p. 169–173, 2013. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2012.06.010>>. .

MORTIMER, S. T.; SWAN, M. A.; MORTIMER, D. Effect of seminal plasma on capacitation and hyperactivation in human spermatozoa. **Human Reproduction**, v. 13, n. 8, p. 2139–2146, 1998.

RICKARD, J. P.; PINI, T.; SOLEILHAVOUP, C.; et al. Seminal plasma aids the survival and cervical transit of epididymal ram spermatozoa. **Reproduction**, v. 148, n. 5, p. 469–478, 2014.

RODELLO, L.; BICUDO, S. D.; FALLEIROS, M. B.; MONTEIRO, C. D.; SAKASHITA, S. M. Implicações da redução na concentração de gema de ovo no meio glicina-gema-leite sobre a cinética, morfologia e integridade de membranas espermáticas em sêmen ovino criopreservado. **Veterinária e Zootecnia**, v. 18, n. 2, p. 239–248, 2011.

RODRIGUES, M. A. M.; SOUZA, C. E. A.; MARTINS, J. A. M.; et al. Seminal plasma proteins and their relationship with sperm motility in Santa Ines rams. **Small Ruminant Research**, v. 109, n. 2, p. 94–100, 2013.

SANTOLARIA, P.; VICENTE-FIEL, S.; PALACÍN, I.; et al. Predictive capacity of sperm quality parameters and sperm subpopulations on field fertility after artificial insemination in sheep. **Animal Reproduction Science**, v. 163, p. 82–88, 2015. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.10.001>>. .

SOLEILHAVOUP, C.; TSIKIS, G.; LABAS, V.; et al. Ram seminal plasma proteome and its impact on liquid preservation of spermatozoa. **Journal of Proteomics**, v. 109, p. 245–260, 2014.

SONGSASEN, N.; TONG, J.; LEIBO, S. Birth of live mice derived by in vitro fertilization with spermatozoa retrieved up to twenty-four hours after death. **J Exp Zool**, v. 280, n. 2, p. 189–196, 1998.

TAMAYO-CANUL, J.; ÁLVAREZ, M.; MATA-CAMPUZANO, M.; et al. Effect of storage method and extender osmolality in the quality of cryopreserved epididymal ram spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 129, n. 3–4, p. 188–199, 2011. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432011002855>>. Acesso em: 22/9/2016.

VÁSQUEZ, J.; FLORENTINI, E. A.; CAMARGO, L. A.; et al. Hypoosmotic swelling test in epididymal ram (*Ovis aries*) spermatozoa. **Livestock Science**, v. 157, n. 2–3,

p. 618–622, 2013. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S187114131300396X>>. Acesso em: 11/12/2015.

VÁSQUEZ, J. H.; NÚÑEZ, V. H.; FLORENTINI, E. A.; et al. Effects of five cryoprotective agents on quality of sheep epididymal spermatozoa during pre-freezing. **Livestock Science**, v. 152, n. 1, p. 94–99, 2013.

WAY, A. M. Y. L.; GRIEL JR., L. C.; KILLIAN, G. J. Effects of accessory sex gland fluid on viability, capacitation, and acrossome reaction of cauda epididymal bull spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 2, p. 213–219, 2000.

WEISS, R. R.; MURADAS, P. R.; GRANEMAN, L. C.; et al. Freezing sperm from cauda epididymis of castrated stallions. **Animal Reproduction Science**, v. 107, n. 3–4, p. 356, 2008.

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesta tese, foi possível avaliar de forma ampla o efeito do período *post mortem* sobre viabilidade, preservação e fertilidade de espermatozoides ovinos recuperados de epidídimos mantidos à temperatura ambiente até 48 horas após a morte.

Nas amostras a fresco, comprovamos que os espermatozoides recuperados dos epidídimos logo após a morte são similares ao sêmen colhido em vagina artificial nos parâmetros de motilidade total, motilidade progressiva, resistência ao teste hiposmótico e morfologia. Concluímos que é possível recuperar espermatozoides da cauda de epidídimos expostos à temperatura ambiente até 48 horas após a morte, contudo, a motilidade total decresce a partir de 24 horas pós-morte e, a partir de 48 horas pós-morte, a taxa de recuperação é menor pelo método de flutuação. Assim, delimitamos uma janela de tempo em que é possível aproveitar o material genético de reprodutores de interesse zootécnico ou de animais em vias de extinção, possibilitando a preservação do genótipo.

A preservação, após recuperação espermática, é importante para aumentar o período de disponibilidade do material genético e assim permitir a utilização das amostras na fertilização *in vivo* e *in vitro*. Avaliamos os dois principais métodos de preservação espermática: a refrigeração e a criopreservação. Identificamos que a preservação espermática (refrigeração e congelação) é possível até 24 horas *post mortem*. A partir deste período, a qualidade e fertilidade das amostras espermáticas ficam deterioradas a ponto de não justificar sua preservação.

Foi identificado, pela primeira vez em ovinos, três subpopulações espermáticas nos espermatozoides recuperados de epidídimos mantidos à temperatura ambiente. Este estudo pode ser usado como base para outros pesquisadores que busquem investigar a fisiologia e os processos aplicados a espermatozoides epididimários na espécie ovina. A análise multivariada para caracterização de subpopulações permitiu a avaliação mais profunda da motilidade das amostras analisadas e conclusões que não seriam possíveis quando os métodos de análise de médias foram utilizados. Foi possível concluir que existem diferenças entre o sêmen colhido em vagina artificial e os espermatozoides recuperados de epidídimos, e que o padrão de motilidade dos espermatozoides é alterado pelo período *post mortem* em momento anterior a 24

horas. Contudo, não encontramos correlação significativa entre as subpopulações identificadas e a fertilidade após inseminação artificial intrauterina.

O plasma seminal representaria um aditivo barato, rápido e simples de ser obtido em propriedade rurais. No entanto, não identificamos efeito positivo da adição de 20% de plasma seminal sobre as amostras analisadas após refrigeração ou criopreservação.

Por fim, os relatos apresentados nesta tese fornecem a pesquisadores, técnicos e produtores informações básicas e aplicadas sobre o potencial de utilização dos espermatozoides ovinos recuperados após a morte, possibilitando a preservação do material genético de animais superiores.

## REFERÊNCIAS

- ABAIGAR, T.; HOLT, W. V.; HARRISON, R. A.; DEL BARRIO, G. Sperm subpopulations in boar (*Sus scrofa*) and gazelle (*Gazella dama mhorr*) semen as revealed by pattern analysis of computer-assisted motility assessments. **Biology of reproduction**, v. 60, n. 1, p. 32–41, 1999.
- ABELLA, D. F.; COSTA, M. DA; GUÉRIN, Y.; DACHEUX, J. L. Fertility of undiluted ram epididymal spermatozoa stored for several days at 4 ° C. **Animal**, v. 9, n. 2, p. 313–319, 2015.
- ALVAREZ, M.; TAMAYO-CANUL, J.; ANEL, E.; et al. Sperm concentration at freezing affects post-thaw quality and fertility of ram semen. **Theriogenology**, v. 77, n. 6, p. 1111–1118, 2012. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.10.013>>. .
- ÁLVAREZ, M.; TAMAYO-CANUL, J.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, C.; et al. Specificity of the extender used for freezing ram sperm depends of the spermatozoa source (ejaculate, electroejaculate or epididymis). **Animal reproduction science**, v. 132, n. 3–4, p. 145–154, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432012001339>>. Acesso em: 1/2/2016.
- AMANN, R. P.; WABERSKI, D. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 5–17, 2014. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.004>>. .
- ANAKKUL, N.; SUWIMONTEERABUTR, J.; THARASANIT, T.; et al. Sperm distribution and fertilization after unilateral and bilateral laparoscopic artificial insemination with frozen-thawed goat semen. **Theriogenology**, v. 82, n. 8, p. 1137–44, 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X14003987>>. Acesso em: 15/2/2016.
- ANEL, L.; KAABI, M.; ABROUG, B.; et al. Factors influencing the success of vaginal and laparoscopic artificial insemination in churra ewes: a field assay. **Theriogenology**, v. 63, n. 4, p. 1235–1247, 2005.
- ARDON, F.; SUAREZ, S. S. Cryopreservation increases coating of bull sperm by seminal plasma binder of sperm proteins BSP1, BSP3, and BSP5. **Reproduction**, v. 146, n. 2, p. 111–117, 2013.
- ARRUDA, R. P.; SILVA, D. F.; AFFONSO, F. J.; et al. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática : momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira De Reprodução Animal**, v. 35, n. 2, p. 145–151, 2011.
- BARBOSA, T. S. R.; WEISS, R. R.; BERGSTEIN-GALAN, T. G.; et al. Comparação da avaliação in vitro de espermatozoides colhidos em vagina artificial ou cauda de epidídimo em carneiros. **ANAIS, UFPR, 24° EVINCI (Evento de Iniciação Científica) e 9° EINTI (Evento de Iniciação Tecnológica e Inovação)**, v. 24, p. 913, 2016.

BERGSTEIN-GALAN, T. G.; WEISS, R. R.; BERTOL, M. A. F.; et al. Comparação entre três métodos de refrigeração do sêmen ovino pelo período de 24 e 48 horas. **Archives of Veterinary Science**, v. 21, n. 4, p. 92–105, 2016.

BERGSTEIN, T. G.; BICUDO, L. C.; RODELLO, L.; et al. Kinematic and spermatid recovery after selection by centrifugation in colloid solutions of ovine cryopreserved semen. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 6, p. 1539–1547, 2016.

BERGSTEIN, T. G.; WEISS, R. R.; BICUDO, S. D. Técnicas de análise de sêmen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 38, n. 4, p. 189–194, 2014.

BERNARDINI, A.; HOZBOR, F.; SANCHEZ, E.; et al. Conserved ram seminal plasma proteins bind to the sperm membrane and repair cryopreservation damage. **Theriogenology**, v. 76, n. 3, p. 436–447, 2011. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X11001026>>. Acesso em: 22/9/2016.

BERTOL, M. A. F.; WEISS, R. R.; KOZICKI, L. E.; et al. In vitro and in vivo fertilization potential of cryopreserved spermatozoa from bull epididymides stored for up to 30 hours at ambient temperature (18 °C–20 °C). **Theriogenology**, v. 86, n. 4, p. 1014–1021, 2016.

BERTOL, M. A. F.; WEISS, R. R.; TOMAZ - SOCCOL, V.; et al. Viability of bull spermatozoa collected from the epididymis stored at 18-20 ° C. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, n. 5, p. 777–783, 2013.

BLASH, S.; MELICAN, D.; GAVIN, W. Cryopreservation of epididymal sperm obtained at necropsy from goats. **Theriogenology**, v. 54, n. 6, p. 899–905, 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X00004003>>. Acesso em: 3/2/2016.

BRAVO, J. A.; MONTANERO, J.; CALERO, R.; et al. Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Ile de France rams. **Animal Reproduction Science**, v. 129, n. 1–2, p. 22–29, 2011. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.10.005>>. .

CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; et al. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. **Animal reproduction science**, v. 104, n. 2–4, p. 119–131, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432007000413>>. Acesso em: 5/5/2016.

CEROVSKY, J. A. A new staining procedure for boar spermatozoa. **Zivocisna Vyroba**, v. 21, p. 351–362, 1976.

COLÁS, C.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A.; MUIÑO-BLANCO, T. Caffeine induces ram sperm hyperactivation independent of cAMP-dependent protein kinase. **International Journal of Andrology**, v. 33, n. 1, 2010.

CONTRI, A.; ZAMBELLI, D.; FAUSTINI, M.; et al. Artificial neural networks for the definition of kinetic subpopulations in electroejaculated and epididymal spermatozoa in the domestic cat. **Reproduction**, v. 144, n. 3, p. 339–347, 2012.

COX, J. F.; ALFARO, V.; MONTENEGRO, V.; et al. Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. **Theriogenology**, v. 66, n. 4, p. 860–867, 2006.

CRESPILHO, A. M.; NICHI, M.; GUAISTI, P. N.; et al. Sperm fertility and viability following 48h of refrigeration: evaluation of different extenders for the preservation of bull semen in liquid state. **Animal reproduction science**, v. 146, n. 3–4, p. 126–133, 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432014000694>>. Acesso em: 1/2/2016.

CSEH, S.; FAIGL, V.; AMIRIDIS, G. S. Semen processing and artificial insemination in health management of small ruminants. **Animal Reproduction Science**, v. 130, n. 3–4, p. 187–192, 2012. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.01.014>>. .

D'AMOURS, O.; BORDELEAU, L. J.; FRENETTE, G.; et al. Binder of sperm 1 and epididymal sperm binding protein 1 are associated with different bull sperm subpopulations. **Reproduction**, v. 143, n. 6, p. 759–771, 2012.

DOMÍNGUEZ, M. P.; FALCINELLI, A.; HOZBOR, F.; et al. Seasonal variations in the composition of ram seminal plasma and its effect on frozen-thawed ram sperm. **Theriogenology**, v. 69, n. 5, p. 564–573, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X07006498>>. Acesso em: 15/2/2016.

DORADO, J.; ALCARÁZ, L.; DUARTE, N.; et al. Changes in the structures of motile sperm subpopulations in dog spermatozoa after both cryopreservation and centrifugation on PureSperm® gradient. **Animal Reproduction Science**, v. 125, n. 1–4, p. 211–218, 2011. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.03.013>>. .

DORADO, J.; MOLINA, I.; MUÑOZ-SERRANO, A.; et al. Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Florida goats. **Theriogenology**, v. 74, n. 5, p. 795–804, 2010.

DOTT, H. M.; HARRISON, R. A.; FOSTER, G. C. The maintenance of motility and the surface properties of epididymal spermatozoa from bull, rabbit and ram in homologous seminal and epididymal plasma. **Journal of reproduction and fertility**, v. 55, p. 113–124, 1979.

EHLING, C.; RATH, D.; STRUCKMANN, C.; et al. Utilization of frozen-thawed epididymal ram semen to preserve genetic diversity in Scrapie susceptible sheep breeds. **Theriogenology**, v. 66, n. 9, p. 2160–2164, 2006.

EL-HAJJ GHAOUI, R.; THOMSON, P. C.; LEAHY, T.; et al. Autologous whole ram seminal plasma and its vesicle-free fraction improve motility characteristics and membrane status but not in vivo fertility of frozen-thawed ram spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, n. 5, p. 541–549, 2007.

FERNÁNDEZ-SANTOS, M. R.; DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO, A. E.; ESTESO, M. C.; et al. Refrigerated storage of red deer epididymal spermatozoa in the epididymis, diluted and with vitamin c supplementation. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, n. 2, p. 212–220, 2009.

FERRAZ, M. A. M. M.; MORAT, R.; YESTE, M.; et al. Evaluation of sperm subpopulation structure in relation to invitro sperm-oocyte interaction of frozen-thawed semen from Holstein bulls. **Theriogenology**, v. 81, n. 8, p. 1067–1072, 2014. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.01.033>>. .

FILHO, A. C. M.; SILVA, H. V. R.; FREITAS, L. A.; et al. Refrigeração do epidídimo canino a 4°C e recuperação dos espermatozoides epididimários utilizando ACP-106c. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 9, p. 1155–1160, 2013.

FREITAS-DELL'AQUA, C. P.; GUAISTI, P. N.; MONTEIRO, G. A.; et al. Flow cytometric analysis of fertile and subfertile frozen stallion spermatozoa. **Animal Reproduction**, v. 9, p. 941, 2012.

FRÉOUR, T.; JEAN, M.; MIRALLIÉ, S.; DUBOURDIEU, S.; et al. Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA) parameters and their evolution during preparation as predictors of pregnancy in intrauterine insemination with frozen-thawed donor semen cycles. **European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology**, v. 149, n. 2, p. 186–189, 2010.

GALLEGO, V.; VÍLCHEZ, M. C.; PEÑARANDA, D. S.; et al. Subpopulation pattern of eel spermatozoa is affected by post-activation time, hormonal treatment and the thermal regimen. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 27, n. 3, p. 529, 2015. Disponível em: <<http://www.publish.csiro.au/?paper=RD13198>>. Acesso em: 22/9/2016.

GAÑÁN, N.; GOMENDIO, M.; ROLDAN, E. R. S. Effect of storage of domestic cat (*Felis catus*) epididymides at 5°C on sperm quality and cryopreservation. **Theriogenology**, v. 72, n. 9, p. 1268–1277, 2009.

GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A. RAMÓN, M.; DEL OLMO, E.; et al. Dynamics of sperm subpopulations based on motility and plasma membrane status in thawed ram spermatozoa incubated under conditions that support in vitro capacitation and fertilization. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 26, n. 5, 2013.

GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; et al. Sperm characteristics and in vitro fertilization ability of thawed spermatozoa from Black Manchega ram: electroejaculation and postmortem collection. **Theriogenology**, v. 72, n. 2, p. 160–8, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X0900096X>>. Acesso em: 3/2/2016.

GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; RAMÓN, M.; et al. Analysis of selected sperm by density gradient centrifugation might aid in the estimation of in vivo fertility of thawed ram spermatozoa. **Theriogenology**, v. 74, n. 6, p. 979–988, 2010. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.04.027>>. .

GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; et al. Sperm characteristics and in vitro fertilization ability of thawed spermatozoa from Black Manchega ram: Electroejaculation and postmortem collection. **Theriogenology**, v. 72, n. 2, p. 160–168, 2009.

- GARDE, J.; ORTIZ, N.; GARCIA, J.; LOPEZ, A.; et al. Criopreservación postmortem de material espermático e inseminación artificial en el ciervo ibérico. **Arch. Zootec**, v. 47, n. 189, p. 351–356, 1998. Disponível em: <[http://www.uco.es/organiza/servicios/publica/az/php/az.php?idioma\\_global=0&la\\_revista=1&revista=26&codigo=383&que\\_busca=Ba](http://www.uco.es/organiza/servicios/publica/az/php/az.php?idioma_global=0&la_revista=1&revista=26&codigo=383&que_busca=Ba)>. .
- GRAHAM, J. K. Effect of seminal plasma on the motility of epididymal and ejaculated spermatozoa of the ram and bull during the cryopreservation process. **Theriogenology**, v. 41, n. 5, p. 1151–1162, 1994.
- HALLAP, T.; NAGY, S.; JAAKMA, Ü.; JOHANNISSON, A.; et al. Usefulness of a triple fluorochrome combination Merocyanine 540/Yo-Pro 1/Hoechst 33342 in assessing membrane stability of viable frozen-thawed spermatozoa from Estonian Holstein AI bulls. **Theriogenology**, v. 65, n. 6, p. 1122–1136, 2006.
- HEROLD, F. .; AURICH, J. .; GERBER, D. Epididymal sperm from the African buffalo (*Syncerus caffer*) can be frozen successfully with AndroMed® and with Triladyl™ but the addition of bovine seminal plasma is detrimental. **Theriogenology**, v. 61, n. 4, p. 715–724, 2004.
- HISHINUMA, M.; SEKINE, J. Separation of canine epididymal spermatozoa by Percoll gradient centrifugation. **Theriogenology**, v. 61, n. 2–3, p. 365–372, 2004.
- HOLT, W. V.; VAN LOOK, K. J. W. Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory test of semen quality. **Reproduction**, v. 127, n. 5, p. 527–535, 2004.
- JONES, R. Sperm survival versus degradation in the mammalian epididymis: A hypothesis. **Biology of reproduction**, v. 75, p. 1405–1411, 2004.
- KAABI, M.; PAZ, P.; ALVAREZ, M.; et al. Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. **Theriogenology**, v. 60, p. 1249–1259, 2003.
- KANEKO, T.; FUKUMOTO, K.; HARUGUCHI, Y.; et al. Fertilization of C57BL/6 mouse sperm collected from cauda epididymides after preservation or transportation at 4°C using laser-microdissected oocytes. **Cryobiology**, v. 59, n. 1, p. 59–62, 2009.
- KASIMANICKAM, R.; KASIMANICKAM, V.; TIBARY, A.; et al. Effect of semen extenders on sperm parameters of ram semen during liquid storage at 4°C. **Small Ruminant Research**, v. 99, n. 2–3, p. 208–213, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0921448811001532>>. Acesso em: 27/1/2016.
- KIKUCHI, K.; NAGAI, T.; KASHIWAZAKI, N.; et al. Cryopreservation and ensuing in vitro fertilization ability of boar spermatozoa from epididymides stored at 4°C. **Theriogenology**, v. 50, n. 4, p. 615–623, 1998. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X98001666>>. Acesso em: 13/11/2015.
- KOZIOŁ, K.; KOZIOROWSKI, M. Morphological defects of epididymal spermatozoa in male roe deer (*Capreolus capreolus*) during the reproductive season. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 18, n. 3, 2015. Disponível em: <<http://www.degruyter.com/view/j/pjvs.2015.18.issue-3/pjvs-2015-0073/pjvs-2015-0073.xml>>. Acesso em: 22/9/2016.

LEAHY, T.; DE GRAAF, S. P. Seminal plasma and its effect on ruminant spermatozoa during processing. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. SUPPL.4, p. 207–213, 2012.

LEAHY, T.; MARTI, J. I.; EVANS, G.; et al. Seasonal variation in the protective effect of seminal plasma on frozen–thawed ram spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 119, n. 1–2, p. 147–153, 2010. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432009003029>>. Acesso em: 22/9/2016.

LEDESMA, A.; FERNÁNDEZ-ALEGRE, E.; CANO, A.; et al. Seminal plasma proteins interacting with sperm surface revert capacitation indicators in frozen-thawed ram sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 173, p. 35–41, 2016.

LOBO, R. N. B.; LOBO, A. M. B. O. Melhoramento genético como ferramenta para o crescimento e o desenvolvimento da ovinocultura de corte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 2, p. 247–253, 2007.

LONE, F. A.; ISLAM, R.; KHAN, M. Z.; et al. Effect of transportation temperature on the quality of cauda epididymal spermatozoa of ram. **Animal reproduction science**, v. 123, n. 1–2, p. 54–59, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432010004471>>. Acesso em: 2/6/2016.

LÓPEZ-PÉREZ, A.; PÉREZ-CLARIGET, R. Ram seminal plasma improves pregnancy rates in ewes cervically inseminated with ram semen stored at 5 °C for 24 hours. **Theriogenology**, v. 77, n. 2, p. 395–399, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X11004171>>. Acesso em: 5/2/2016.

LUNA, C.; YESTE, M.; RIVERA DEL ALAMO, M. M.; et al. Effect of seminal plasma proteins on the motile sperm subpopulations in ram ejaculates. **Reproduction, fertility, and development**, v. 29, p. 394–405, 2015.

MARCO-JIMÉNEZ, F.; VICENTE, J. S.; VIUDES-DE-CASTRO, M. P. Seminal Plasma Composition from Ejaculates Collected by Artificial Vagina and Electroejaculation in Guirra Ram. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, n. 4, p. 403–408, 2008.

MARI, G.; CASTAGNETTI, C.; RIZZATO, G.; et al. Density gradient centrifugation of sperm from a subfertile stallion and effect of seminal plasma addition on fertility. **Animal Reproduction Science**, v. 126, n. 1–2, p. 96–100, 2011. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.04.020>>. .

MAROTO-MORALES, A.; RAMÓN, M.; GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; et al. Sperm head phenotype and male fertility in ram semen. **Theriogenology**, v. 84, n. 9, p. 1536–1541, 2015. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.07.038>>. .

MAROTO-MORALES, A.; RAMÓN, M.; GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; et al. Characterization of ram (*Ovis aries*) sperm head morphometry using the Sperm-Class Analyzer. **Theriogenology**, v. 73, n. 4, p. 437–448, 2010.

MARTÍ, J. I.; APARICIO, I. M.; GARCÍA-HERREROS, M. Sperm morphometric subpopulations are differentially distributed in rams with different maturity age in

cryopreserved ejaculates. **Theriogenology**, v. 76, n. 1, p. 97–109, 2011. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.01.022>>. .

MARTÍNEZ-PASTOR, F.; ANEL, L.; GUERRA, C.; et al. Seminal plasma improves cryopreservation of Iberian red deer epididymal sperm. **Theriogenology**, v. 66, n. 8, p. 1847–1856, 2006. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X0600286X>>. Acesso em: 22/9/2016.

MARTINEZ-PASTOR, F.; DIAZ-CORUJO, A. R.; ANEL, E.; et al. Post mortem time and season alter subpopulation characteristics of Iberian red deer epididymal sperm. **Theriogenology**, v. 64, n. 4, p. 958–974, 2005.

MARTINEZ-PASTOR, F.; GARCIA-MACIA, V.; ALVAREZ, M.; et al. Sperm Subpopulations in Iberian Red Deer Epididymal Sperm and Their Changes Through the Cryopreservation Process. **Biology of Reproduction**, v. 72, n. 2, p. 316–327, 2005. Disponível em: <<http://www.biolreprod.org/cgi/doi/10.1095/biolreprod.104.032730>>. .

MARTINEZ-PASTOR, F.; GARCIA-MACIAS, V.; ALVAREZ, M.; et al. Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer. **Theriogenology**, v. 65, n. 3, p. 471–485, 2006.

MARTINEZ-PASTOR, F.; GUERRA, C.; KAABI, M.; et al. Decay of sperm obtained from epididymes of wild ruminants depending on postmortem time. **Theriogenology**, v. 63, n. 1, p. 24–40, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X04001037>>. Acesso em: 27/5/2016.

MARTÍNEZ-PASTOR, F.; MARTÍNEZ, F.; GARCÍA-MACÍAS, V.; et al. A pilot study on post-thawing quality of Iberian red deer spermatozoa (epididymal and electroejaculated) depending on glycerol concentration and extender osmolality. **Theriogenology**, v. 66, n. 5, p. 1165–1172, 2006.

MARTÍNEZ-PASTOR, F.; TIZADO, E. J.; GARDE, J. J.; et al. Statistical Series: Opportunities and challenges of sperm motility subpopulation analysis. **Theriogenology**, v. 75, n. 5, p. 783–795, 2011.

MARTÍNEZ, A. F.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; ÁLVAREZ, M.; et al. Sperm parameters on Iberian red deer: Electroejaculation and post-mortem collection. **Theriogenology**, v. 70, n. 2, p. 216–226, 2008.

MARTINS, C. F.; DRIESSEN, K.; COSTA, P. M.; et al. 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, n. 1, p. 50–57, 2009.

MARTINS, K. R.; GHELLER, S. S. M.; FERREIRA, C. E. R.; et al. Post-thawing quality of ram spermatozoa is impaired by inclusion of boar seminal plasma in the freezing extender. **Small Ruminant Research**, 2016.

MATA-CAMPUZANO, M.; ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ, M.; TAMAYO-CANUL, J.; et al. Refrigerated storage of ram sperm in presence of Trolox and GSH antioxidants: Effect of temperature, extender and storage time. **Animal Reproduction Science**, v. 151, n. 3–4, p. 137–147, 2014. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432014003042>>. .

MATA-CAMPUZANO, M.; SOLEILHAVOUP, C.; TSIKIS, G.; et al. Motility of liquid stored ram spermatozoa is altered by dilution rate independent of seminal plasma concentration. **Animal reproduction science**, v. 162, p. 31–6, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432015300154>>. Acesso em: 11/1/2016.

MEHR, M. R.A.; MOUSAVI, M.; GHADAMYARI, M. Effect of seminal plasma proteins on membrane cholesterol efflux of ram epididymal spermatozoa. **Small Ruminant Research**, v. 129, p. 88–91, 2015a.

MEHR, M. R.A.; MOUSAVI, M.; GHADAMYARI, M. Effect of seminal plasma proteins on membrane cholesterol efflux of ram epididymal spermatozoa. **Small Ruminant Research**, v. 129, p. 88–91, 2015b. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0921448815002540>>. Acesso em: 22/9/2016.

MELO, C. M.; PAPA, F. O.; FIORATTI, E. G.; et al. Comparison of three different extenders for freezing epididymal stallion sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 107, n. 3–4, p. 331, 2008.

MOCÉ, E.; GRAHAM, J. K. In vitro evaluation of sperm quality. **Animal Reproduction Science**, v. 105, n. 1–2, p. 104–118, 2008.

MONTEIRO, G. A.; FREITAS-DELL'AQUA, C. P.; GUASTI, P. N.; et al. Comparison of apoptotic cells between cryopreserved ejaculated sperm and epididymal sperm in stallions. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, n. 7, p. 552–556, 2013. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2012.08.010>>. .

MONTEIRO, G. A.; GUASTI, P. N.; ROCHA, A. S.; et al. Effect of Storage Time and Temperature of Equine Epididymis on the Viability, Motion Parameters, and Freezability of Epididymal Sperm. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, n. 3, p. 169–173, 2013. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2012.06.010>>. .

MONTEIRO, G. A.; PAPA, F. O.; ZAHN, F. S.; et al. Cryopreservation and fertility of ejaculated and epididymal stallion sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 127, n. 3–4, p. 197–201, 2011.

MORRELL, J. M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; JOHANNISSON, A. Single layer centrifugation of stallion spermatozoa improves sperm quality compared with sperm washing. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 21, n. 3, p. 429–436, 2010.

MORTIMER, S. T.; SWAN, M. A.; MORTIMER, D. Effect of seminal plasma on capacitation and hyperactivation in human spermatozoa. **Human Reproduction**, v. 13, n. 8, p. 2139–2146, 1998.

MOSCARDINI, M. M.; SCOTT, C.; MOURA, D. S.; et al. Viabilidade de espermatozoides ovinos mantidos a 5° y 15°C en diferentes sistemas de refrigeración \* Viability of ram sperm chilled at 5° and 15°C in different cooling systems. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v. 21, n. 2, p. 122–126, 2014.

MUIÑO, R.; TAMARGO, C.; HIDALGO, C. O.; et al. Identification of sperm

subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Holstein bulls: Effects of cryopreservation and between-bull variation. **Animal Reproduction Science**, v. 109, n. 1–4, p. 27–39, 2008. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432007003375>>. Acesso em: 10/3/2017.

NEILD, D.; MIRAGAYA, M.; CHAVES, G.; et al. Cryopreservation of cauda epididymis spermatozoa from slaughterhouse testicles 24 hours after ground transportation. **Animal Reproduction Science**, v. 94, n. 1–4, p. 92–95, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432006001187>>. Acesso em: 2/6/2016.

NICHI, M.; RIJSSELAERE, T.; LOSANO, J.; et al. Evaluation of epididymis storage temperature and cryopreservation conditions for improved mitochondrial membrane potential, membrane integrity, sperm motility and in vitro fertilization in bovine epididymal sperm. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 7, 2016.

O'HARA, L.; HANRAHAN, J. P.; RICHARDSON, L.; et al. Effect of storage duration, storage temperature, and diluent on the viability and fertility of fresh ram sperm. **Theriogenology**, v. 73, n. 4, p. 541–549, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X09004695>>. Acesso em: 1/2/2016.

O'MEARA, C. M.; DONOVAN, A.; HANRAHAN, J. P.; et al. Resuspending ram spermatozoa in seminal plasma after cryopreservation does not improve pregnancy rate in cervically inseminated ewes. **Theriogenology**, v. 67, n. 7, p. 1262–1268, 2007.

O'MEARA, C. M.; HANRAHAN, J. P.; PRATHALINGAM, N. S.; et al. Relationship between in vitro sperm functional tests and in vivo fertility of rams following cervical artificial insemination of ewes with frozen-thawed semen. **Theriogenology**, v. 69, n. 4, p. 513–522, 2008.

OKAZAKI, T.; AKIYOSHI, T.; KAN, M.; et al. Artificial Insemination With Seminal Plasma Improves the Reproductive Performance of Frozen-Thawed Boar Epididymal Spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 33, n. 5, p. 990–998, 2012.

QUINTERO-MORENO, A.; MIRÓ, J.; TERESA RIGAU, A.; et al. Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. **Theriogenology**, v. 59, n. 9, p. 1973–1990, 2003.

RICKARD, J. P.; PINI, T.; SOLEILHAVOUP, C.; et al. Seminal plasma aids the survival and cervical transit of epididymal ram spermatozoa. **Reproduction**, v. 148, n. 5, p. 469–478, 2014.

RICKARD, J. P.; SCHMIDT, R. E.; MADDISON, J. W.; et al. Variation in seminal plasma alters the ability of ram spermatozoa to survive cryopreservation. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 28, n. 4, p. 516, 2016. Disponível em: <<http://www.publish.csiro.au/?paper=RD14123>>. Acesso em: 22/9/2016.

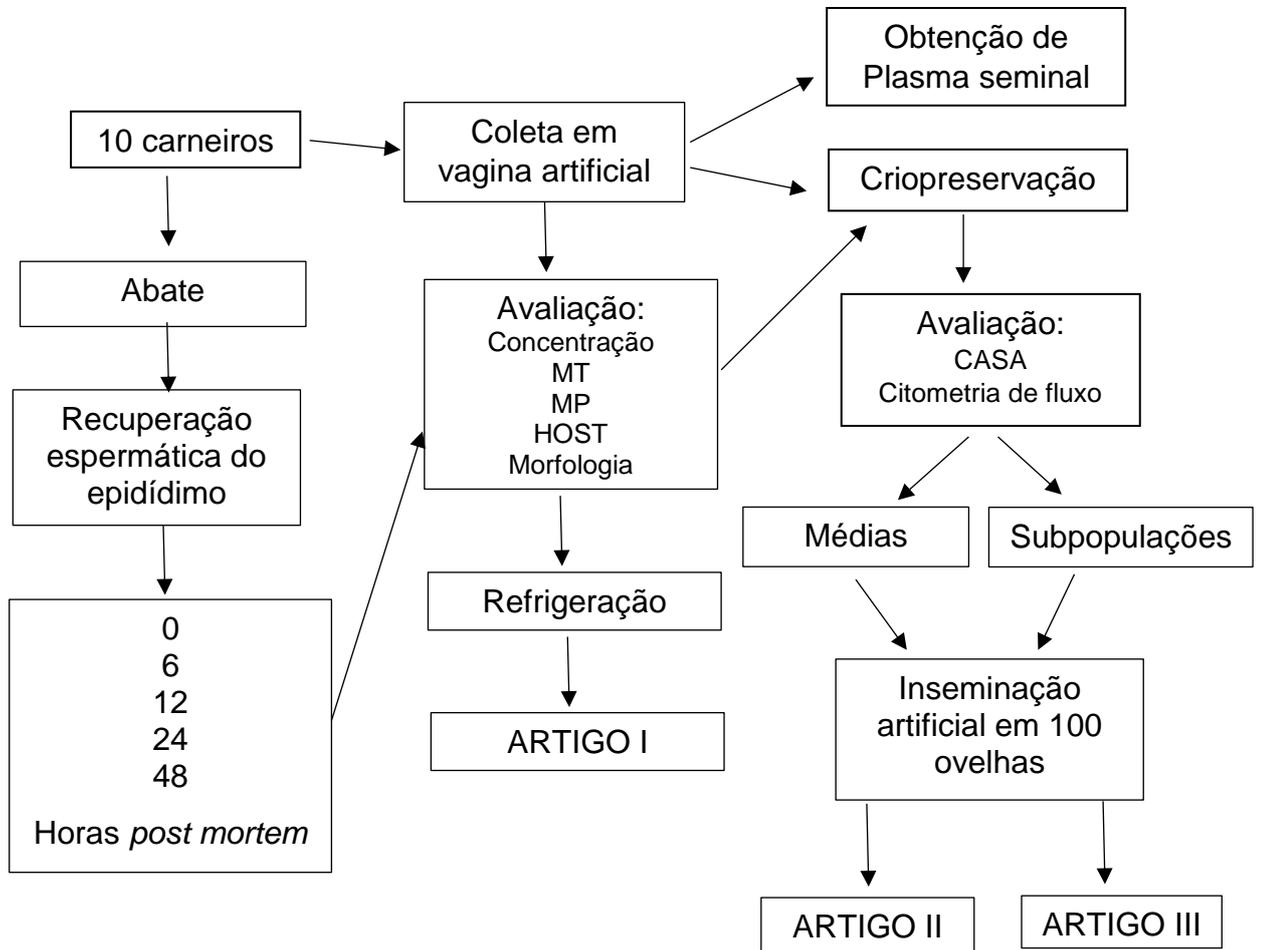
RODELLO, L. **Validação de sistema automatizado de refrigeração e congelamento de sêmen ovino**, 2006. Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

- RODELLO, L.; BICUDO, S. D.; FALLEIROS, M. B.; et al. Implicações da redução na concentração de gema de ovo no meio glicina-gema-leite sobre a cinética, morfologia e integridade de membranas espermáticas em sêmen ovino criopreservado. **Veterinária e Zootecnia**, v. 18, n. 2, p. 239–248, 2011.
- RODRIGUES, M. A. M.; SOUZA, C. E. A.; MARTINS, J. A. M.; et al. Seminal plasma proteins and their relationship with sperm motility in Santa Ines rams. **Small Ruminant Research**, v. 109, n. 2, p. 94–100, 2013.
- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ. State of the art in farm animal sperm evaluation. **Reproduction , Fertility and Development**, v. 19, n. 1, p. 91–101, 2006.
- SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. **Animal Reproduction Science**, v. 38, n. 1–2, p. 1–36, 1995.
- SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, n. 1–3, p. 77–111, 2000.
- SANTOLARIA, P.; VICENTE-FIEL, S.; PALACÍN, I.; et al. Predictive capacity of sperm quality parameters and sperm subpopulations on field fertility after artificial insemination in sheep. **Animal Reproduction Science**, v. 163, p. 82–88, 2015. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.10.001>>. .
- SARIÖZKAN, S.; ÖZDAMAR, S.; TÜRK, G.; et al. In vitro effects of L-carnitine and glutamine on motility, acrosomal abnormality, and plasma membrane integrity of rabbit sperm during liquid-storage. **Cryobiology**, v. 68, n. 3, p. 349–353, 2014.
- SOLEILHAVOUP, C.; TSIKIS, G.; LABAS, V.; et al. Ram seminal plasma proteome and its impact on liquid preservation of spermatozoa. **Journal of Proteomics**, v. 109, p. 245–260, 2014.
- SONGSASEN, N.; TONG, J.; LEIBO, S. Birth of live mice derived by in vitro fertilization with spermatozoa retrieved up to twenty-four hours after death. **J Exp Zool**, v. 280, n. 2, p. 189–196, 1998.
- STECKLER, D.; STOUT, T. A. E.; DURANDT, C.; et al. Validation of merocyanine 540 staining as a technique for assessing capacitation-related membrane destabilization of fresh dog sperm. **Theriogenology**, v. 83, n. 9, p. 1451–1460, 2015. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.01.019>>. .
- TAMAYO-CANUL, J.; ALVAREZ, M.; LÓPEZ-URUEÑA, E.; et al. Undiluted or extended storage of ram epididymal spermatozoa as alternatives to refrigerating the whole epididymes. **Animal reproduction science**, v. 126, n. 1–2, p. 76–82, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432011001175>>. Acesso em: 1/2/2016.
- TAMAYO-CANUL, J.; ÁLVAREZ, M.; MATA-CAMPUZANO, M.; et al. Effect of storage method and extender osmolality in the quality of cryopreserved epididymal ram spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 129, n. 3–4, p. 188–199, 2011. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432011002855>>. Acesso em: 22/9/2016.

- TITTARELLI, C. M.; JURADO, S. B.; NUÑEZ-FAVRE, R.; et al. Effect of Storage Media and Storage Time on Histological and Ultrastructural Changes in Cat Epididymal Cells. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. SUPPL. 6, p. 281–283, 2012.
- TITTARELLI, C.; SAVIGNONE, C. A.; ARNAUDÍN, E.; et al. Effect of storage media and storage time on survival of spermatozoa recovered from canine and feline epididymides. **Theriogenology**, v. 66, n. 6–7, p. 1637–1640, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X06000367>>. Acesso em: 13/11/2015.
- TOYONAGA, M.; TSUTSUI, T. The Quality of Cryopreserved Sperm Collected from Feline Caudal Epididymides Using Seminal Plasma. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 74, n. 10, p. 1349–1353, 2012.
- VARISLI, O.; UGUZ, C.; AGCA, C.; et al. Motility and acrosomal integrity comparisons between electro-ejaculated and epididymal ram sperm after exposure to a range of anisotonic solutions, cryoprotective agents and low temperatures. **Animal Reproduction Science**, v. 110, n. 3, p. 256–268, 2009.
- VÁSQUEZ, J.; FLORENTINI, E. A.; CAMARGO, L. A.; et al. Hypoosmotic swelling test in epididymal ram (*Ovis aries*) spermatozoa. **Livestock Science**, v. 157, n. 2–3, p. 618–622, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S187114131300396X>>. Acesso em: 11/12/2015.
- VÁSQUEZ, J. H.; NÚÑEZ, V. H.; FLORENTINI, E. A.; et al. Effects of five cryoprotective agents on quality of sheep epididymal spermatozoa during pre-freezing. **Livestock Science**, v. 152, n. 1, p. 94–99, 2013.
- VERNET, P.; AITKEN, R. J.; DREVET, J. R. Antioxidant strategies in the epididymis. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 216, n. 1–2, p. 31–39, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0303720703004532>>. Acesso em: 4/5/2016.
- VIEIRA, L. A.; GADEA, J.; GARCÍA-VÁZQUEZ, F. A.; et al. Equine spermatozoa stored in the epididymis for up to 96 h at 4°C can be successfully cryopreserved and maintain their fertilization capacity. **Animal Reproduction Science**, v. 136, n. 4, p. 280–288, 2013.
- WAY, A. M. Y. L.; GRIEL JR., L. C.; KILLIAN, G. J. Effects of accessory sex gland fluid on viability, capacitation, and acrossome reaction of cauda epididymal bull spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 2, p. 213–219, 2000.
- WEISS, R. R.; MURADAS, P. R.; GRANEMAN, L. C.; et al. Freezing sperm from cauda epididymis of castrated stallions. **Animal Reproduction Science**, v. 107, n. 3–4, p. 356, 2008.
- YÁNIZ, J. L.; PALACÍN, I.; VICENTE-FIEL, S.; et al. Sperm population structure in high and low field fertility rams. **Animal Reproduction Science**, v. 156, p. 128–134, 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037843201500069X>>. Acesso em: 9/3/2017.
- ZALAZAR, L.; LEDESMA, A.; HOZBOR, F.; et al. Heterologous recombinant protein

with decapacitating activity prevents and reverts cryodamage in ram sperm: An emerging biotechnological tool for cryobiology. **Animal Reproduction Science**, v. 164, p. 31–39, 2016.

## APÊNDICE 1 – Fluxograma do experimento



## ANEXO 1 – Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**  
**SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**  
**CERTIFICADO**

Certificamos que o protocolo número 052/2016, referente ao projeto “**Congelabilidade e fertilidade de sêmen coletado de cauda de epidídimo, mantido em temperatura ambiente, de carneiros**”, sob a responsabilidade de **Romildo Romualdo Weiss** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro, de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - BRASIL, com grau 2 de invasividade, em reunião de 06/07/2016.

Vigência do projeto	Agosto/2016 até Março/2017
Espécie/Linhagem	<i>Ovis aries</i> (ovino)
Número de animais	110
Peso/Idade	50 kg / 1 a 3 anos
Sexo	Ambos (10 machos e 100 fêmeas)
Origem	Fazenda em Balsa Nova – PR

### CERTIFICATE

We certify that the protocol number 052/2016, regarding the project “**Fertility and freezeability of semen collected from epididymis tail, kept at room temperature, of rams**” under **Romildo Romualdo Weiss** supervision – which includes the production, maintenance and/or utilization of animals from Chordata phylum, Vertebrata subphylum (except Humans), for scientific or teaching purposes – is in accordance with the precepts of Law nº 11.794, of 8 October, 2008, of Decree nº 6.899, of 15 July, 2009, and with the edited rules from Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), and it was approved by the ANIMAL

USE ETHICS COMMITTEE OF THE AGRICULTURAL SCIENCES CAMPUS OF THE UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ (Federal University of the State of Paraná, Brazil), with degree 2 of invasiveness, in session of 06/07/2016.

Duration of the project	August/2016 until March/2017
Specie/Line	<i>Ovis aries</i> (ovine)
Number of animals	110
Wheight/Age	50 kg / 1 to 3 years
Sex	Both (10 males and 100 females)
Origin	Farm at Balsa Nova – PR

Curitiba, 6 de julho de 2016.

Simone Tostes de Oliveira Stedile

**Coordenadora CEUASCA**

Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias - UFPR