

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**EFEITO DO MEIO DILUIDOR E DA DOSE INSEMINANTE SOBRE A
CONGELABILIDADE E FERTILIDADE DE ESPERMATOZÓIDES
RECUPERADOS DA CAUDA DO EPIDÍDIMO DE GARANHÕES**

PRISCILLA NASCIMENTO GUASTI

BOTUCATU-SP

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**EFEITO DO MEIO DILUIDOR E DA DOSE INSEMINANTE SOBRE A
CONGELABILIDADE E FERTILIDADE DE ESPERMATOZÓIDES
RECUPERADOS DA CAUDA DO EPIDÍDIMO DE GARANHÕES**

PRISCILLA NASCIMENTO GUASTI

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária (Área de concentração: Reprodução Animal), como parte das exigências para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa

BOTUCATU-SP

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Guasti, Priscilla Nascimento.

Efeito do meio diluidor e da dose inseminante sobre a congelabilidade e fertilidade de espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo de garanhões / Priscilla Nascimento Guasti. - Botucatu, 2010

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2010

Orientador: Frederico Ozanam Papa

Capes: 50504002

1. Equino - Espermatozoides. 2. Inseminação artificial. 3. Fecundidade.

Palavras-chave: Cauda do epidídimo; Criopreservação espermática; Diluidor; Dose inseminante; Equino; Fertilidade; Pentoxifilina.

Nome da Autora: Priscilla Nascimento Guasti

Título: EFEITO DO MEIO DILUIDOR E DA DOSE INSEMINANTE SOBRE A
CONGELABILIDADE E FERTILIDADE DE ESPERMATOZÓIDES
RECUPERADOS DA CAUDA DO EPIDÍDIMO DE GARANHÕES

COMISSÃO EXAMINADORA

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

Prof. Dra. Fernanda da Cruz Landim-Alvarenga
Membro
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP - Botucatu

Prof. Dr. Julio Cesar Ferraz Jacob
Membro
Departamento de Reprodução e Avaliação Animal
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Seropédica - RJ

Data da Defesa: 19 de novembro de 2010

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus queridos pais Luiz Carlos Guasti e Vera Lucia Nascimento Guasti pelo amor, exemplo de vida e pela luta constante em prol da minha formação e educação. Que mesmo apesar da distância, se mantiveram presentes com muito amor e carinho. Amo vocês!

**“Quando você tem uma meta, o que era um obstáculo
passa a ser uma etapa de um dos planos.”**

Gerhard Erich Boehme

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e pela saúde, por ter colocado pessoas tão especiais em meu caminho, por me orientar nas escolhas certas, por me dar forças nos momentos mais difíceis e por fazer possível a realização de cada conquista.

Aos meus pais Vera e Guasti, pelo amor incondicional, contínuo apoio e pela grande confiança e fé que sempre depositaram nas minhas decisões. Registro minha eterna gratidão e admiração por vocês.

A todos os meus familiares, em especial, minha avó Davina, avó Conceição, avô Lourival, Jorge, Jânio, tia Rosângela, tio Jorginho e tia Rosana. Obrigada por estarem ao meu lado e por acreditarem em meu potencial.

As minhas queridas e amadas amigas: Juliana, Lígia, Roberta, Aline, Tabhata, Naiara e Ana, que apesar da distância, a força de nossa amizade vence toda e qualquer barreira.

A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu pela oportunidade de ingresso na pós-graduação.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela minha formação acadêmica fundamental em meus avanços profissionais.

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

Ao Professor Titular Frederico Ozanam Papa pela orientação, por suas idéias, conhecimentos e experiência oferecidos. Ainda, pela amizade e confiança dispensadas e, sobretudo, pela seriedade e profissionalismo que tanto contribuíram para minha formação.

Ao Professor Julio César Ferraz Jacob pelo exemplo de profissionalismo, amizade desde os tempos da graduação e incentivo às atividades acadêmicas, seus ensinamentos ultrapassaram a barreira de mestre-aluno.

Ao Professor José Eugênio Três, Vera Jesus, Marco Roberto de Mello e Ana Cristina da UFRRJ pelas primeiras lições na Área de Reprodução Animal, estímulo e amizade.

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

Aos Funcionários do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária pelos bons momentos de convívio e pela amizade.

Ao Dr. José Carlos Martin e ao Haras Itapuã, pelo grande apoio e auxílio pela disponibilidade de garantões para a prática experimental.

Ao Gabriel, pela amizade, companheirismo e paciência em todas as fases do projeto de pesquisa.

Aos grandes amigos que conquistei em Botucatu: Fernanda, Simone, Gabriel, Rosiára, Márcio, Aline, Ana Paula, Natália, Giovana, Jair, Leandro e Andreza.

Aos pós-graduandos do Ceran: André, Bió, Zé, Camila, Rosiára, Aline, Gabriel, Vitor, Bruno, Ian, Eduardo, Marcel e Leandro pela ajuda, convivência, troca de conhecimentos e amizade que tornaram os dias tão agradáveis durante esses anos.

A Rosiára, Márcio, Ieda, Jair, Miguel, Rafael, Camila, Alexandra, Juliana e Carlos pela ajuda fundamental na segunda etapa experimental e pelos momentos de muita alegria.

Aos colegas pós-graduandos e residentes pelo convívio e amizade por todos esses anos.

Aos equinos utilizados no desenvolvimento deste projeto de pesquisa.

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

LISTA DE ABREVIATURAS

μ L: microlitro;

μ m: micrômetro;

ALH: amplitude do deslocamento lateral de cabeça;

AMPC: adenosina monofosfato cíclico;

BCF: frequência de batimento flagelares;

BSA: soro fetal bovino;

CASA: análise computadorizada do movimento espermático;

cm: centímetro;

DPBS: solução salina fosfato-tamponada Dulbecco;

g: gravidade;

GnRH: hormônio liberador de gonadotrofina;

HTMO: Hamilton Thorne Research;

Hz: hertz;

ICSI: injeção intracitoplasmática de espermatozóide;

IMP: integridade de membrana plasmática;

iv: intravenoso;

LIN: linearidade;

MESA: aspiração microcirúrgica de espermatozóides do epidídimo;

mg: miligrama;

mL: mililitro;

mm^3 : milímetro cúbico;

mM: milimolar;

MoT: motilidade total;

MP: motilidade progressiva;

PESA: aspiração percutânea de espermatozóides do epidídimo;

PKA: proteína kinase A;

PTX: pentoxifilina;

Rap: espermatozóides rápidos;

STR: retilinearidade;

VAP: velocidade média de trajeto;

VCL: velocidade curvilinear;

VSL: velocidade linear progressiva.

LISTA DE TABELAS

Páginas

TABELA – 1: Valores médios e desvios padrão da motilidade total (MoT; %), progressiva (MP; %), velocidade de trajeto (VAP; $\mu\text{m/s}$), velocidade linear progressiva (VSL; $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilinear (VCL; $\mu\text{m/s}$), amplitude do deslocamento lateral de cabeça (ALH; μm), frequência de batimentos (BCF; Hz), retilinearidade (STR; %), linearidade do movimento (LIN; %) e espermatozóides rápidos (Rap; %) e integridade de membrana plasmática (IMP; %) das amostras recém-recuperadas em diluidor sem (Botu-Sêmen[®] – Controle) ou com pentoxifilina (Botu-Turbo[®] – PTX).....**25**

TABELA – 2: Valores médios e desvios padrão da motilidade total (MoT; %), progressiva (MP; %), velocidade de trajeto (VAP; $\mu\text{m/s}$), velocidade linear progressiva (VSL; $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilinear (VCL; $\mu\text{m/s}$), amplitude do deslocamento lateral de cabeça (ALH; μm), frequência de batimentos (BCF; Hz), retilinearidade (STR; %), linearidade do movimento (LIN; %) e espermatozóides rápidos (Rap; %) das amostras incubadas à 37°C por 15 minutos em diluidor sem (Botu-Sêmen[®] – Controle) ou com pentoxifilina (Botu-Turbo[®] – PTX).....**26**

TABELA – 3: Valores médios e desvios padrão da motilidade total (MoT; %), progressiva (MP; %), velocidade de trajeto (VAP; $\mu\text{m/s}$), velocidade linear progressiva (VSL; $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilinear (VCL; $\mu\text{m/s}$), amplitude do deslocamento lateral de cabeça (ALH; μm), frequência de batimentos (BCF; Hz), retilinearidade (STR; %), linearidade do movimento (LIN; %) e espermatozóides rápidos (Rap; %) das amostras recuperadas em diluidor sem (Botu-Sêmen[®] – Controle) ou com pentoxifilina (Botu-Turbo[®] – PTX), após a centrifugação e ressuspensão com o diluidor de congelamento Botu-Crio[®].....**27**

TABELA – 4: Valores médios e desvios padrão da motilidade total (MoT; %), progressiva (MP; %), velocidade de trajeto (VAP; $\mu\text{m/s}$), velocidade linear progressiva (VSL; $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilinear (VCL; $\mu\text{m/s}$), amplitude do deslocamento lateral de cabeça (ALH; μm), frequência de batimentos (BCF; Hz), retilinearidade (STR; %), linearidade do movimento (LIN; %), espermatozóides rápidos (Rap; %) e integridade de membrana plasmática (IMP; %) das amostras recuperadas em diluidor sem (Botu-Sêmen[®] – Controle) ou com pentoxifilina (Botu-Turbo[®] – PTX) e criopreservadas com o diluidor de congelamento Botu-Crio[®] após a descongelação à 46°C por 20 segundos.....**28**

TABELA – 5: Valores médios e desvios da avaliação da fosforilação da tirosina das amostras recuperadas em diluidor sem (Botu-Sêmen[®] – Controle) ou com pentoxifilina (Botu-Turbo[®] – PTX) e criopreservadas com o diluidor de congelação Botu-Crio[®].....**28**

TABELA – 6: Valores médios e desvios padrão da motilidade total (MoT; %), progressiva (MP; %), velocidade de trajeto (VAP; $\mu\text{m/s}$), velocidade linear progressiva (VSL; $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilinear (VCL; $\mu\text{m/s}$), amplitude do deslocamento lateral de cabeça (ALH; μm), frequência de batimentos (BCF; Hz), retilinearidade (STR; %), linearidade do movimento (LIN; %) e espermatozóides rápidos (Rap; %) das amostras após a recuperação (T0) e incubação à 37°C por 15 minutos (T15) em diluidor sem pentoxifilina (Botu-Sêmen[®] – Controle), após a centrifugação e ressuspensão em Botu-Crio[®] e descongelação à 46°C por 20 segundos....**29**

TABELA – 7: Valores médios e desvios padrão da motilidade total (MoT; %), progressiva (MP; %), velocidade de trajeto (VAP; $\mu\text{m/s}$), velocidade linear progressiva (VSL; $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilinear (VCL; $\mu\text{m/s}$), amplitude do deslocamento lateral de cabeça (ALH; μm), frequência de batimentos (BCF; Hz), retilinearidade (STR; %), linearidade do movimento (LIN; %) e espermatozóides rápidos (Rap; %) das amostras após a recuperação (T0) e incubação à 37°C por 15 minutos (T15) em diluidor com pentoxifilina (Botu-Turbo[®]) após a centrifugação e ressuspensão em Botu-Crio[®] e descongelação à 46°C por 20 segundos.....**30**

TABELA – 8: Valores da motilidade total (MoT; %), progressiva (MP; %), velocidade de trajeto (VAP; $\mu\text{m/s}$), velocidade linear progressiva (VSL; $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilinear (VCL; $\mu\text{m/s}$), amplitude do deslocamento lateral de cabeça (ALH; μm), frequência de batimentos (BCF; Hz), retilinearidade (STR; %), linearidade do movimento (LIN; %) e espermatozóides rápidos (Rap; %) para o “pool de espermatozóides” recém-recuperado (T0) em diluidor sem (Botu-Sêmen[®] – Controle) ou com pentoxifilina (Botu-Turbo[®] – PTX) e após a incubação à 37°C por 15 minutos (T15).....**33**

TABELA – 9: Valores da motilidade total (MoT; %), progressiva (MP; %), velocidade de trajeto (VAP; $\mu\text{m/s}$), velocidade linear progressiva (VSL; $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilinear (VCL; $\mu\text{m/s}$), amplitude do deslocamento lateral de cabeça (ALH; μm), frequência de batimentos (BCF; Hz), retilinearidade (STR; %), linearidade do movimento (LIN; %) e espermatozóides rápidos (Rap; %) para o “pool de espermatozóides” recuperados da cauda do epidídimo em diluidor sem (Botu-Sêmen[®] – Controle) ou com pentoxifilina (Botu-Turbo[®] – PTX) após a centrifugação e ressuspensão com o diluidor de congelação Botu-Crio[®] e após a descongelação.....**34**

TABELA – 10: Valores médios e desvios da avaliação da fosforilação da tirosina das amostras recuperadas em diluidor sem (Botu-Sêmen[®] – Controle) ou com pentoxifilina (Botu-Turbo[®] – PTX) e criopreservadas com o diluidor de congelamento Botu-Crio[®]**34**

TABELA – 11: Índices de concepção para éguas inseminadas de acordo com o meio diluidor utilizado na recuperação dos espermatozóides da cauda do epidídimo e da dose inseminante.....**36**

TABELA – 12: Efeito das variáveis meio diluidor e dose inseminante sobre os índices de concepção.....**36**

TABELA – 13: Índices de concepção para éguas inseminadas em função da dose inseminante, independente do diluidor utilizado na recuperação dos espermatozóides da cauda do epidídimo.....**36**

TABELA – 14: Índices de concepção para éguas inseminadas em função do meio diluidor utilizado na recuperação dos espermatozóides da cauda do epidídimo, independente da dose inseminante aplicada.....**37**

LISTA DE FIGURAS***Páginas***

- FIGURA – 1:** Etapas do Método de Flutuação: **(a)** separação da cauda do epidídimo e remoção do tecido conjuntivo que recobre a cauda do epidídimo; **(b)** incisões para proporcionar a migração dos espermatozóides do lúmen da cauda do epidídimo; **(c)** repouso para migração dos espermatozóides para o meio diluidor.....**09**
- FIGURA – 2:** Etapas do Método de Fluxo Retrógrado: **(a)** separar o complexo testículo-epidídimo; **(b)** remover o tecido conjuntivo que recobre a cauda do epidídimo e **(c)** desfazer os contornos da cauda do epidídimo.....**10**
- FIGURA – 3:** Método do Fluxo Retrógrado: após a secção do ducto da cauda do epidídimo em três partes, o mesmo é estendido na posição vertical e o meio diluidor injetado no lúmen até a outra extremidade.....**10**
- FIGURA – 4:** Integridade de membrana plasmática (%) das amostras após a recuperação ou após a descongelação em diluidor sem (Controle) ou com 7,18 mM de pentoxifilina (PTX).....**31**

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1.0 – INTRODUÇÃO.....	01
2.0 – REVISÃO DE LITERATURA.....	03
2.1 – Anatomofisiologia do Epidídimo.....	03
2.2 – Capacitação Espermática.....	05
2.3 – Colheita de Espermatozóides da Cauda do Epidídimo.....	07
2.3.1 – <i>Métodos de Colheita de Espermatozóides da Cauda do Epidídimo</i>	08
2.3.1.1 – <i>Método de Flutuação</i>	08
2.3.1.2 – <i>Método de Perfuração</i>	09
2.3.1.3 – <i>Método do Fluxo Retrógrado</i>	09
2.4 – Fertilidade de Espermatozóides da Cauda do Epidídimo.....	11
2.5 – Inseminação Artificial com Baixa Dose Inseminante.....	13
3.0 – OBJETIVOS.....	16
4.0 – MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4.1 – <u>Experimento I</u> : Efeito do meio diluidor utilizado na metodologia do fluxo retrógrado sobre a congelabilidade de espermatozóides da cauda do epidídimo equino.....	17
4.1.2 – <i>Animais e Local da Pesquisa</i>	17
4.1.3 – <i>Orquiectomia Bilateral</i>	17
4.1.4 – <i>Colheita dos Espermatozóides da Cauda do Epidídimo</i>	18
4.1.5 – <i>Congelação dos Espermatozóides da Cauda do Epidídimo</i>	19
4.1.6 – <i>Avaliação Laboratorial das Amostras Recuperadas da Cauda do Epidídimo</i>	19
4.1.5 – <i>Análise Estatística</i>	21
4.2 – <u>Experimento II</u> : Influência do meio diluidor e da dose inseminante sobre os índices de fertilidade de espermatozóides criopreservados da cauda do epidídimo...	21
4.2.1 – <i>Animais e Local da Pesquisa</i>	21
4.2.2 – <i>Colheita e Congelação dos Espermatozóides da Cauda do Epidídimo</i>	22
4.2.3 – <i>Avaliação Laboratorial das Amostras Recuperadas da Cauda do Epidídimo</i>	22
4.2.4 – <i>Teste de Fertilidade</i>	22

4.2.5 – <i>Análise Estatística</i>	23
5.0 – RESULTADOS.....	24
5.1 – <u>Experimento I</u>	24
5.2 – <u>Experimento II</u>	32
5.2.1 – <i>Avaliação Laboratorial do “Pool de Espermatozóides” Recuperado da Cauda do Epidídimo</i>	32
5.2.2 – <i>Avaliação dos Índices de Fertilidade</i>	35
6.0 – DISCUSSÃO.....	37
6.1 – <u>Experimento I</u>	37
6.2 – <u>Experimento II</u>	42
7.0 – CONCLUSÕES.....	44
8.0 – REFERÊNCIAS.....	45
9.0 – TRABALHO CIENTÍFICO.....	57
ANEXOS.....	63

GUASTI, P.N. **Efeito do meio diluidor e da dose inseminante sobre a congelabilidade e fertilidade de espermatozóides recuperados da cauda do epidídimo de garanhões.** Botucatu. 2010 Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

A colheita de espermatozóides da cauda do epidídimo e sua criopreservação representam um grande avanço biotecnológico na equinocultura, e pode ser a última chance de preservação do material genético de garanhões após sua morte inesperada ou lesões que impossibilitem a cobertura ou colheita de sêmen. Os objetivos dessa pesquisa foram comparar a efetividade de dois diluidores utilizados para a recuperação dos espermatozóides epididimários em relação aos índices de congelabilidade determinados laboratorialmente (Experimento I) e as taxas de concepção proporcionadas por cada metodologia ao utilizar baixa dose inseminante (Experimento II). No Experimento I foram utilizados 58 testículos, o ducto epididimário de um testículo de cada garanhão foi lavado com o diluidor sem pentoxifilina–Botu-Sêmen^{®1} (Controle) e o ducto epididimário do testículo contralateral, com o diluidor contendo 7,18 mM de pentoxifilina–Botu-Turbo^{®2} (PTX). No Experimento II, foi utilizado um “pool de espermatozóides” dos testículos de dois garanhões. As amostras foram congeladas e direcionadas às inseminações artificiais em diferentes doses inseminantes, formando os seguintes grupos: 800×10^6 espermatozóides recuperados com o diluidor sem pentoxifilina (800 Controle), 100×10^6 espermatozóides recuperados com diluidor sem pentoxifilina (100 Controle) e 100×10^6 espermatozóides recuperados com o diluidor com pentoxifilina (100 PTX). O índice de concepção para as éguas inseminadas nos grupos 800 Controle, 100 Controle e 100 PTX foi de 68% (11/16), 31,25% (5/16) e 50% (8/16), respectivamente. Frente aos resultados obtidos, conclui-se inseminações artificiais com apenas 100×10^6 espermatozóides colhidos com o meio diluidor contendo pentoxifilina garantem índices aceitáveis de concepção e maximiza o uso de espermatozóides epididimários congelados.

Palavras-chave: Pentoxifilina; Cauda do epidídimo; Dose inseminante; Diluidor; Criopreservação espermática; Fertilidade; Equino.

¹ Biotech Ltda, Botucatu , Brasil.

² Biotech Ltda, Botucatu , Brasil.

GUASTI, P.N. Effect of extender and insemination dose on the freezability and fertility of stallion epididymal sperm. Botucatu. 2010 Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The recovery of spermatozoa from epididymal cauda and its cryopreservation represents a great technological advance, since it is the last possibility to preserve genetic material from dead or deceased valuable males. The aims of this study were to compare the effectiveness of two extenders used for recovery of epididymal sperm in relation to its freezability (Experiment I) and conception rates provided by each methodology using a low insemination dose (Experiment II). In Experiment I, 58 testis were used, epididymal cauda of each stallion were separated and flushed with a skim milk-extender either without (Botu-Sêmen[®]; Control Group) or with 7,18 mM of pentoxifylline (Botu-Turbo[®]; PTX Group) and then frozen. In Experiment II, a “pool” of epididymal sperm from 2 stallions was used. The samples were frozen and artificial insemination was performed using different insemination doses, comprising the following groups: 800x10⁶ sperm recovered without PTX (800 Control); 100x10⁶ sperm recovered without PTX (100 Control) and 100x10⁶ sperm recovered with PTX (100 PTX). The conception rates were 68% (11/16), 31.25% (5/16) e 50% (8/16) for 800 Control, 100 Control and 100 PTX group, respectively. Based in these results, it was possible to conclude that artificial inseminations with 100x10⁶ sperm recovered with PTX guarantee acceptable conception rates and maximize the use of frozen equine epididymal sperm.

Keywords: Pentoxifylline; Cauda epididymis; Insemination dose; Extender; Sperm Cryopreservation; Fertility; Equine.

1.0 – INTRODUÇÃO

A equinocultura brasileira ocupa posição de destaque internacional pelo expressivo número de animais e pela excelência de seu plantel. Adicionalmente, a indústria do cavalo é uma importante área geradora de divisas e empregos no Brasil. Contudo, para se manter um país competitivo, se faz necessário a incorporação de novas biotecnologias para acelerar e facilitar o melhoramento genético.

Nos últimos anos, diversos trabalhos têm sido realizados visando aprimorar as técnicas de recuperação, criopreservação e inseminação de espermatozóides da cauda do epidídimo, entretanto poucos pesquisadores conseguiram êxito em seus estudos. Os melhores resultados obtidos com esta biotécnica, foram realizados por pesquisadores brasileiros, que demonstraram índices de concepção de 66,6 % (PAPA et al., 2008) e 92,3% (MONTEIRO, 2010), o que garante posição de destaque no cenário internacional de avanços na biotecnologia da reprodução em equinos.

A relevância da aplicabilidade da biotécnica de espermatozóides epididimários se dá principalmente por possibilitar a recuperação e criopreservação de células espermáticas viáveis de garanhões que tenham a sua vida reprodutiva interrompida, seja por morte inesperada, processos obstrutivos, ou distúrbios traumáticos que impossibilitem a cobertura ou colheita de sêmen. Nestes casos, tal procedimento é indicado principalmente para garanhões com alto valor genético, pois minimiza a perda do germoplasma e conseqüentemente possibilita a obtenção de produtos geneticamente superiores mesmo após a incapacidade reprodutiva ou morte do reprodutor.

Dentre os estudos realizados com espermatozóides epididimários em equinos podem se destacar o desenvolvimento e aprimoramento de técnicas de colheita (CARY et al., 2004; BRUEMMER, 2006), comparação de meios diluidores (MELO et al., 2008; PAPA et al., 2008; GUSTI et al., 2009), refrigeração espermática (MONTEIRO, 2010), efeito da adição de plasma seminal (MORRIS et al., 2002; TIPLADY et al., 2002; MOORE et al., 2005; PASQUINI, et al., 2008; HEISE et al., 2010), viabilidade espermática de garanhões sub-férteis (MONTEIRO, 2010), teste de fertilidade (PAPA et al., 2008; HEISE et al., 2010), métodos de inseminação artificial (MORRIS, 2002) e injeção intracitoplasmática de espermatozóide (HERRERA et al., 2006).

Entretanto, os espermatozóides epididimários se encontram em sua maioria imóveis após a técnica de colheita. Estudos bioquímicos, em roedores e bovinos, demonstram que as células espermáticas permanecem quiescentes nos fluidos epididimários (TURNER & REICH, 1985), e o desenvolvimento da motilidade está associado com o

aumento dos níveis intra-espermáticos de pH, AMPc e íons cálcio, mediadores responsáveis pela ativação da cinética espermática (HOSKINS et al., 1978; KANN & SERRES, 1980).

A adição de substâncias específicas nos diluidores utilizados na lavagem da cauda do epidídimo pode estimular a motilidade espermática e permitir o melhor aproveitamento das células recuperadas. A pentoxifilina, um derivado da metilxantina, inibe a atividade da enzima fosfodiesterase em células vivas, levando ao aumento de AMPc intracelular e conseqüente incremento da cinética espermática (CALOGERO et al., 1998). No entanto, poucos estudos têm sido realizados com a finalidade de investigar os efeitos da adição de pentoxifilina na criopreservação do sêmen de garanhões.

O desenvolvimento de técnicas de inseminação artificial que possibilitam a deposição de baixo número de espermatozóides próximo ao sítio de fertilização tem sido realizado no intuito de melhorar os índices de fertilidade de garanhões subfêrteis e férteis de alto potencial (MORRIS, 2004; LEÃO, 2006), favorecendo a utilização do sêmen congelado e evitando perdas espermáticas ou reações inflamatórias no trato reprodutivo da fêmea (HUNTER & GREVE, 1998).

A colheita de espermatozóides da cauda do epidídimo e sua criopreservação permitem a preservação do germoplasma de reprodutores mesmo após a perda da capacidade reprodutiva por trauma ou óbito. No entanto, ao considerar o limitado número de doses espermáticas recuperadas com esta biotecnologia e o valor genético do garanhão, se faz necessário diminuir a dose inseminante a ser aplicada, por possibilitar a maximização do uso dos espermatozóides epididimários criopreservados, ao garantir maior número de éguas inseminadas e conseqüente retorno econômico.

O sucesso recentemente alcançado com os índices de fertilidade dos espermatozóides recuperados do epidídimo em equinos mostra a importância da realização de novos estudos que testem protocolos de recuperação, criopreservação e inseminação destas células.

O presente estudo baseia-se no estudo da influência do meio diluidor sobre os índices de congelabilidade de espermatozóides da cauda do epidídimo equino (expressos através dos resultados das análises computadorizadas das células espermáticas, determinação de integridade de membrana plasmática e avaliação da fosforilação da tirosina) e sobre os índices de concepção quando utilizadas diferentes doses inseminantes.

2.0 – REVISÃO DE LITERATURA

2.1 – Anatomofisiologia do Epidídimo

Após sua formação no ambiente testicular, o espermatozóide necessita passar por um processo de maturação para que seja capaz de fertilizar o oócito. Durante o trânsito epididimário, as células espermáticas sofrem modificações substanciais em sua função, composição e organização e passam a adquirir motilidade progressiva, habilidade de reconhecimento e ligação com a zona pelúcida e fusão com a membrana plasmática do oócito (GATTI et al., 2004).

O epidídimo é um ducto único altamente enovelado, justaposto a superfície externa do testículo que se estende do polo anterior ao polo posterior do mesmo, e é ligado de forma mais ou menos firme, dependendo da espécie, pela túnica albugínea e pelo tecido conectivo. Esta estrutura pode ser dividida anatomicamente em três segmentos: cabeça, onde há absorção de aproximadamente 80% do fluido oriundo da rede testis (MARENGO, 2008); corpo, onde os espermatozoides passam a apresentar capacidade fecundante, e cauda, cuja função básica é o armazenamento e a manutenção de espermatozoides maduros (SHIVAJI, 1988).

A divisão anatômica do epidídimo é baseada nas características histológicas e bioquímicas do órgão, entretanto, há uma variação significativa desta divisão entre as diferentes espécies (COOPER, 1986). Cada região secreta substâncias específicas que promovem mudanças na composição química e protéica do fluido epididimário, essenciais para a manutenção da viabilidade da célula espermática, bem como importantes alterações morfofuncionais nas células espermáticas (DACHEUX et al., 2003).

As principais funções do epidídimo compreendem a concentração de espermatozoides; maturação funcional; armazenamento das células espermáticas em um estado quiescente até a ejaculação; remoção de espermatozoides degenerados; oferta de condições adequadas para a sobrevivência das células; transporte espermático pelas células mióides; proteção; e manutenção da barreira hemato-epididimária (MARENGO, 2008).

O número de espermatozoides com habilidade de se movimentar aumenta regularmente entre a cabeça e a cauda do epidídimo. No entanto, a motilidade potencial existe já no espermatozóide imaturo da cabeça do epidídimo. Esta é expressa à medida que os espermatozoides transitam pelo ducto epididimário, onde são observadas

mudanças nos níveis intra-espermáticos de AMPc, pH e cálcio (WADE et al., 2003). A eliminação de zinco das fibras densas externas durante o trânsito epididimário permite a formação de pontes de dissulfeto, o que contribui para o enrijecimento das fibras e consequente geração da motilidade, especialmente motilidade progressiva (HENKEL et al., 1999). Além disso, a presença de proteínas específicas na cauda do epidídimo, imobilinas, aumenta a viscosidade do fluido epididimário e dificulta a movimentação das células espermáticas (USSELMAN & CONE, 1983).

Com relação às alterações referentes ao metabolismo dos espermatozóides, no corpo do epidídimo ocorre o aumento do metabolismo oxidativo e glicolítico e na cauda principalmente, ocorre a diminuição do conteúdo de lipídeos neutros e colesterol (GATTI et al., 2004).

As mudanças funcionais envolvem alterações do padrão de atividade flagelar e habilidade de se ligar a zona pelúcida. Mudanças na composição da membrana plasmática contribuem para tais mudanças funcionais. Estas são refletidas em alterações na carga elétrica da superfície celular, ligação de lecitinas, distribuição de partículas intra-membranas, fluidez da membrana, composição de lipídeos e proteínas e ligação de anticorpos (GATTI et al., 2004).

A grande maioria das proteínas presentes no plasma seminal é proveniente do epidídimo e estão envolvidas na remodelação da membrana espermática, que ocorre durante o trânsito epididimário e após a ejaculação (DACHEUX et al., 2003).

A secreção de proteínas no epidídimo é altamente regionalizada, sendo a cabeça e a cauda as regiões mais ativas. Na espécie bovina, a atividade secretória na região da cabeça é 6 a 8 vezes maior que na região da cauda, e, na espécie eqüina, cerca de 73% dos compostos protéicos são secretados na cabeça do epidídimo (DACHEUX et al., 2003; GATTI et al., 2004).

As proteínas epididimárias adquiridas pela membrana espermática durante o trânsito epididimário são classificadas de acordo com o tipo de interação com a célula espermática. Podem ocorrer ligações fracas, responsáveis pela quiescência dos espermatozóides; ligações fortes, importantes no trato reprodutivo da fêmea e na fertilização; modificações das proteínas da membrana plasmática, encobrendo ou expondo receptores; ou presença de proteínas livres no fluido epididimário, colaborando com a manutenção do meio (MARENCO et al., 2008).

A glicosilfosfatidilinositol é adquirida pela membrana plasmática como proteína integral e sua transferência do fluido epididimário para a membrana parece ser mediada por epididissomos (SOSTARIC et al., 2008).

Os epididissomos constituem pequenas vesículas membranosas que se associam a determinadas proteínas, possibilitando a aquisição de novos componentes protéicos pela membrana, como: P25b, proteína ligadora à zona pelúcida; HE/CD52, associada a infertilidade imunológica em humanos; MIF (fator inibitório para migração de macrófagos); GPX-5, fator anti-oxidante e SPAM1/PH-20, exerce função semelhante a hialuronidase e age como receptor para zona pelúcida; e enzimas da via poliol (aldose redutase e sorbitol desidrogenase), envolvidas na modulação da motilidade espermática durante o trânsito epididimário (SOSTARIC et al., 2008).

Na cabeça e no corpo do epidídimo, os espermatozóides possuem carga elétrica positiva, no entanto, na cauda, modificações na natureza e no conteúdo de sacarídeos e glicoproteínas da superfície da membrana plasmática promovem a alteração da carga elétrica, deixando-a negativa. Esta alteração leva a capacidade de adesão do espermatozóide ao oócito (GATTI et al., 2004).

Portanto, a passagem do espermatozóide pelo epidídimo e as alterações morfofuncionais adquiridas durante o trajeto representam um passo essencial para tornar estas células espermáticas capazes de fertilizar o oócito (GATTI et al., 2004).

2.2 – Capacitação Espermática

Os espermatozóides maturados no epidídimo possuem habilidade de movimentação ativa e de fertilização. Entretanto, após a ejaculação ou colheita do epidídimo, os espermatozóides devem permanecer no trato reprodutivo feminino por algum tempo e passar por uma série de alterações morfológicas e metabólicas, modificações estas conhecidas coletivamente como capacitação espermática, que constitui o passo inicial para o processo de fertilização (VISCONTI et al., 2002).

O local onde ocorre a capacitação varia de acordo com a espécie, contudo, não consiste em um processo espécie-específico (YANAGIMACHI, 1994). Nas espécies em que a ejaculação é intra-uterina, como em equinos, os espermatozóides sofrem o processo de capacitação no oviduto, especificamente na região inicial do istmo (BAZER et al., 1995). Nos ruminantes, os espermatozóides são depositados no interior da vagina, deste modo, a capacitação espermática tem início na passagem das células espermáticas

pelo muco cervical, promovendo a remoção de substâncias decapacitantes da membrana plasmática (FERRARI, 1997).

O processo de capacitação promove importantes modificações na membrana plasmática e no metabolismo espermático, sendo estes essenciais na ligação do espermatozóide com a zona pelúcida, onde ocorrerá a reação acrossomal. Portanto, em condições *in vivo*, as etapas da capacitação previnem a ativação prematura das enzimas acrossomais, até que o espermatozóide atinja o local de fertilização do oócito, na ampola da tuba uterina (BAZER et al., 1995).

O colesterol possui uma importante função na estabilização da membrana espermática. Durante o processo de capacitação *in vivo*, a remoção de colesterol das membranas se dá por meio de sua transferência para albuminas e lipoproteínas de alta densidade presentes na tuba uterina. Assim, tem-se a desestabilização da bicamada lipídica, e conseqüente reorganização de seus componentes e redução da proporção colesterol:fosfolípideo, resultando na fluidez da membrana plasmática (AMANN & GRAHAM, 1993). Deste modo, o efluxo de colesterol e a redistribuição de proteínas da bicamada lipídica promovem alterações na permeabilidade da membrana, particularmente na abertura dos canais de íons cálcio; e também modificações nas propriedades da capacidade de fusão da membrana plasmática, as quais são importantes para a reação acrossômica (AMANN & GRAHAM, 1993).

Adicionalmente, evidências indicam que o bicarbonato facilita a desestabilização da membrana, principalmente na região apical da cabeça do espermatozóide, devido ao fato de que esta substância estaria supostamente presente em níveis superiores na tuba uterina (20 mM) quando comparado ao fluido espermático (<1 mM) (FLESH & GADELLA, 2000; GADELLA & COLENBRANDER, 2003).

Em contato com a membrana plasmática, o bicarbonato ativa diretamente a forma solúvel da enzima adenilciclase, abundante nos espermatozóides de mamíferos, resultando no aumento dos níveis de adenosina monofosfato cíclico (AMPC) que ativa a proteína kinase A (PKA) que, por sua vez, via fosforilação da proteína tirosina, ativa direta ou indiretamente o deslocamento de fosfolípideos da membrana plasmática (FLESH & GADELLA, 2000).

Segundo Gadella e Colenbrander (2003), o bicarbonato atua também na cauda do espermatozóide, o que leva a fosforilação da tirosina e indução da hipermotilidade. Esta se caracteriza por aumento da amplitude do batimento flagelar, devido à maior flexibilidade, principalmente na peça intermediária, e mudança do movimento

progressivo que se torna circular, devido a não rotação da cabeça do espermatozóide. No entanto, os processos de hiperativação e capacitação espermática envolvem mecanismos distintos (BEDFORD, 1990).

Outro elemento envolvido no processo de capacitação é a albumina, que promove o efluxo de colesterol e conseqüente desestabilização da membrana do espermatozóide (FLESH & GADELLA, 2000).

Do mesmo modo, os glicosaminoglicanos são capazes de estimular a capacitação e a reação acrossômica, ao remover os fatores decapacitantes do plasma seminal presentes na membrana espermática de espermatozoides ejaculados (YANAGIMACHI, 1994). Além disso, estudos sugerem que a heparina ligada a superfície do espermatozóide aumenta as concentrações de cálcio e o pH intracelular, e ainda facilita o desprendimento do espermatozóide da tuba uterina (PARRISH et al., 1994).

Como todas as células sob condições aeróbicas, os espermatozoides são capazes de gerar radicais livres, em sua maioria originada da atividade metabólica normal. Ainda que em altas concentrações se tornem prejudiciais ao espermatozóide, em baixas concentrações, os radicais livres possuem um papel importante na função espermática, especificamente na fosforilação de tirosina (BALL et al., 2001; BAUMBER et al., 2003).

A fosforilação da proteína tirosina regula uma variedade de funções celulares, como regulação do crescimento, controle de ciclos celulares, regulação de íons, formação do citoesqueleto, além de ser um componente essencial à capacitação espermática (HUNTER, 1996). Deste modo, a avaliação da fosforilação da proteína tirosina pode ser utilizada como um indicador da capacitação espermática (POMMER et al., 2003)

Além das substâncias endógenas presentes no trato reprodutivo da fêmea, a movimentação dos fosfolipídeos da membrana plasmática pode ser induzida *in vitro* por meio de inibidores da fosfodiesterase, ativadores da PKA, inibidores da fosfatase 1 e 2a e pela adição de análogos do AMPc, o que poderia levar a capacitação espermática (FLESH & GADELLA, 2000).

2.3 – Colheita de Espermatozoides da Cauda do Epidídimo

A colheita de espermatozoides viáveis da cauda do epidídimo tem sido relatada em diversas espécies, como bovinos (MARTINS et al., 2009), cervídeos (FERNANDES-SANTOS et al., 2009), caprinos (MARTINEZ-PASTOR et al., 2005),

suínos (KIKUCHI et al., 1998), felinos (GAÑÁN et al., 2009) e equinos (PAPA et al., 2008). A obtenção de espermatozóides viáveis da cauda do epidídimo tem por finalidade a utilização destas células em técnicas de reprodução assistida, como inseminação artificial (PAPA et al., 2008; HEISE et al., 2010, MONTEIRO, 2010) e injeção intracitoplasmática de espermatozóides (HERRERA et al., 2006).

Estudos demonstram que o número total de espermatozóides recuperados da cauda do epidídimo de garanhões é superior ao encontrado em ejaculados (GRANEMANN, 2006; MURADÁS et al., 2006; MONTEIRO, 2010), devido a função de armazenamento exercida na região da cauda do epidídimo, onde a cada ejaculação apenas uma parte das células espermáticas é liberada do reservatório (SHIVAJI, 1988). E ainda, segundo Tiplady et al. (2002), estas células apresentam motilidade progressiva igual ou superior aos espermatozóides do ejaculado.

2.3.1 – Métodos de Colheita de Espermatozóides da Cauda do Epidídimo

Diversos métodos de recuperação de espermatozóides da cauda do epidídimo são descritos na literatura, entre eles, duas técnicas são aplicadas em pacientes vivos – MESA e PESA, e três são utilizadas para colheita em animais mortos – flutuação, fluxo retrógrado e perfuração (GUERRERO, 2006).

Entretanto, os métodos de recuperação de espermatozóides epididimários em animais mortos são os mais empregados na Medicina Veterinária, devido ao crescente interesse pela preservação de espécies ameaçadas de extinção e preservação de células espermáticas de animais de produção de alto valor genético, impossibilitados de realizar cobertura ou colheita de sêmen com vagina artificial.

2.3.1.1 – Método de Flutuação

O método de flutuação consiste em cortar ou fatiar a cauda do epidídimo (Figura 1a e 1b). Incisões longitudinais são realizadas para exposição dos espermatozóides ao meio exterior. Em seguida, a cauda do epidídimo é mantida em um meio gelatinoso, possibilitando a migração dos espermatozóides para o mesmo (Figura 1c), e a recuperação das células espermáticas é realizada por meio de filtração (YU e LEIBO, 2002). Embora seja frequentemente aplicada a espécies de pequeno porte devido ao tamanho de seus epidídimos, esta técnica também pode ser utilizada na recuperação de espermatozóides do epidídimo de espécies de grande porte (HISHINUMA et al., 2003; GUERRERO, 2006).

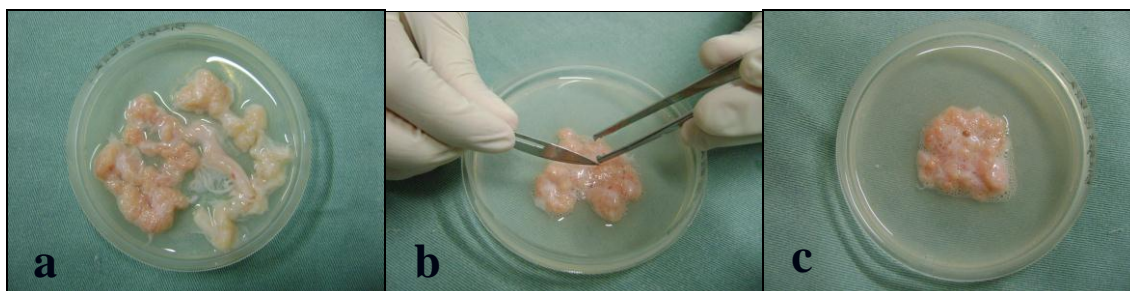


FIGURA – 1: Etapas do Método de Flutuação: **(a)** separação da cauda do epidídimo e remoção do tecido conjuntivo que recobre a cauda do epidídimo; **(b)** incisões para proporcionar a migração dos espermatozóides do lúmen da cauda do epidídimo; **(c)** repouso para migração dos espermatozóides para o meio diluidor (MONTEIRO, 2010).

2.3.1.2 – Método de Perfuração

Na técnica de perfuração, a cauda do epidídimo é posicionada em uma placa de petri e o ducto epididimário é perfurado com auxílio de uma agulha (BARTELS et al., 2000). Posteriormente, as amostras são filtradas e centrifugadas com intuito de diminuir a presença de detritos celulares. Esta técnica proporciona uma elevada taxa de recuperação de espermatozóides, no entanto, a viabilidade espermática pode ser afetada devido à exposição à centrifugação e a componentes sanguíneos (GUERRERO, 2006).

2.3.1.3 – Método do Fluxo Retrógrado

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

A técnica de fluxo retrógrado modificada, relatada por Granemann (2006), consiste na separação do complexo testículo-epidídimo (Figura 2a) seguida pela dissecação do tecido conjuntivo que recobre a cauda do epidídimo (Figura 2b). Em seguida, os contornos do ducto epididimário são desenovelados (Figura 2c), e este deve ser seccionado em três partes para facilitar a lavagem.

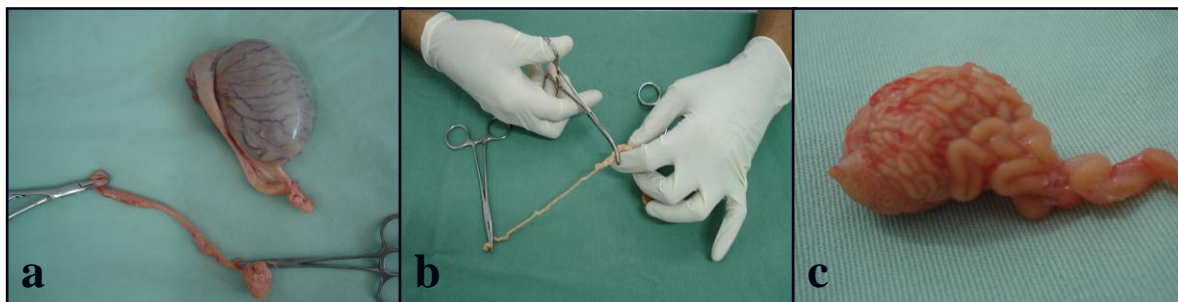


FIGURA – 2: Etapas do Método de Fluxo Retrógado: (a) separar o complexo testículo-epidídimo; (b) remover o tecido conjuntivo que recobre a cauda do epidídimo e (c) desfazer os contornos da cauda do epidídimo (MONTEIRO, 2010).

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



FIGURA – 3: Método do Fluxo Retrógado: após a secção do ducto da cauda do epidídimo em três partes, o mesmo é estendido na posição vertical e o meio diluidor injetado no lúmen até a outra extremidade (MONTEIRO, 2010).

De acordo com estudos realizados com espermatozóides epididimários equinos, diversos meios diluidores a base de leite desnatado ou a base de gema de ovo podem ser utilizados para a lavagem da cauda do epidídimo (CARY et al., 2004.; MURADÁS et al., 2006; JOHNSON & COUTINHO DA SILVA, 2008; PAPA et al., 2008)

Adicionalmente, estudos demonstram resultados satisfatórios ao utilizar meios diluidores com estimuladores de motilidade na recuperação de espermatozóides da

cauda do epidídimo equino (MORRIS et al., 2002; PAPA et al., 2008; PASQUINI et al., 2008; GUASTI et al., 2009). Os estimuladores de motilidade, como as metilxantinas e seus derivados, são inibidores não seletivos da atividade da enzima fosfodiesterase ao aumentar os níveis intracelulares de AMPc, levando ao aumento da cinética espermática (YOVICH, 1993). Ao considerar que a maioria dos espermatozóides da cauda do epidídimo se mantém imóvel nos fluidos epididimários (TURNER & REICH, 1985) e também após o processo de recuperação espermática, a adição destas substâncias estimuladoras poderia ativar a motilidade dos espermatozóides quiescentes recém-recuperados.

2.4 – Fertilidade de Espermatozóides da Cauda do Epidídimo

Barker & Gandier (1957) relataram a primeira prenhez com espermatozóides congelados na espécie eqüina, entretanto, os espermatozóides utilizados neste estudo foram recuperados da cauda do epidídimo e não do ejaculado. No mesmo estudo, foram realizadas oito inseminações e obteve-se a taxa de concepção de 12,5% (1/8).

Estudos recentes em equinos demonstram que os espermatozóides obtidos da cauda do epidídimo podem ser utilizados em inseminações artificiais com sêmen fresco ou congelado e resultando em prenhez (MORRIS et al., 2002; PAPA et al., 2008; HEISE et al., 2010; MONTEIRO, 2010). No entanto, a taxa de concepção destes espermatozóides foi considerada, por muitos anos, inferior ao dos espermatozóides do ejaculado (TIPLADY et al., 2002).

Morris et al. (2002) obtiveram taxa de concepção de 45% em éguas inseminadas com 200×10^6 de espermatozóides da cauda do epidídimo, a fresco. Utilizando esta mesma dose inseminante com espermatozóides congelados, foram obtidos 18 e 8% de taxa de concepção quando as éguas foram inseminadas por histeroscopia e método convencional, respectivamente. Os pesquisadores concluíram que é possível obter produtos utilizando espermatozóides do epidídimo em doses inseminantes com baixo número de espermatozóides, e que a fertilidade cai acentuadamente após o processo de congelamento.

Papa et al. (2008) avaliaram a fertilidade de espermatozóides criopreservados recuperados da cauda do epidídimo de garanhões com a utilização do diluidor de

congelamento Botu-Crio^{®3}, e obtiveram taxas de concepção de 66,6% em éguas inseminadas na extremidade do corno uterino, com 400×10^6 espermatozóides viáveis pré e pós-congelamento. Esta taxa de concepção nunca foi descrita com espermatozóides congelados do epidídimo, sendo equivalente a taxas de concepção obtidas com o uso de espermatozóides congelados do ejaculado (MARTIN et al., 1979; JASKO et al, 1992).

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

Guasti et al. (2009) avaliaram a influência da pentoxifilina sobre os parâmetros de motilidade de espermatozóides recém-recuperados da cauda do epidídimo de garanhões. As amostras recuperadas com meio diluidor contendo pentoxifilina apresentaram melhora na cinética espermática quando comparadas as amostras recuperadas somente com o meio diluidor a base de leite desnatado.

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

Heise et al. (2010) compararam a taxa de concepção de espermatozóides recuperados da cauda epidídimo e acrescidos ou não de plasma seminal (PS). A dose inseminante utilizada foi de 200×10^6 espermatozóides com motilidade progressiva. Deste modo, nas inseminações com espermatozóides do ejaculado obteve-se taxa de concepção de 55,6% com o sêmen a fresco, e de 38,9% com o sêmen congelado. Já, com espermatozóides epididimários, as taxas de fertilidade obtidas na presença do plasma seminal foram de 75% quando utilizados após a recuperação, e de 27,8% para os espermatozóides congelados. Na ausência do plasma seminal, estes valores foram de 22,2% e 6,7% com a utilização de espermatozóides recém recuperados e congelados, respectivamente. Este estudo demonstrou maior capacidade fecundante dos

³ Biotech Ltda, Botucatu , Brasil.

espermatozóides obtidos da cauda do epidídimo de garanhões após adição de plasma seminal.

Monteiro et al. (2010) demonstraram que o contato dos espermatozóides com o plasma seminal em garanhões sub-férteis pode ter efeito deletério sobre a qualidade espermática. Neste estudo, a motilidade total, a motilidade progressiva e a integridade da membrana plasmática dos espermatozóides obtidos da cauda do epidídimo sem contato com plasma seminal, foram superiores aos obtidos nas células provenientes do ejaculado, tanto pré quanto pós congelamento. No teste de fertilidade, os espermatozóides epididimários após a descongelamento apresentaram taxa de concepção de 25% com inseminações na extremidade do corno uterino utilizando 400×10^6 de espermatozóides viáveis por dose inseminante.

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

Em eqüinos, espermatozóides da cauda do epidídimo demonstraram ser resistentes ao processo de criopreservação possibilitando, assim, a obtenção de produtos de garanhões descartados da reprodução ou mesmo após sua morte, a partir de inseminações artificiais convencionais (BARKER e GANDIER, 1957; MORRIS et al., 2002; PAPA et al., 2008; MONTEIRO, 2010), inseminações histeroscópicas (MORRIS et al., 2002) e injeção intracitoplasmática de espermatozóide (HERRERA et al., 2006).

2.5 – Inseminação Artificial com Baixa Dose Inseminante

Para se obter taxas de concepção satisfatórias por meio do método convencional de inseminação, recomenda-se a deposição de no mínimo 200 milhões de espermatozóides com motilidade progressiva no corpo uterino (MORRIS, 2004). No entanto, apenas parte dos espermatozóides depositados no útero tem acesso ao oviduto, devido à seleção espermática que ocorre durante o transporte uterino (PARKER et al., 1975) e a passagem na junção útero-tubárica (VASQUEZ et al., 1998).

O emprego de técnicas de inseminação artificial que permitem a aplicação de baixa dose inseminante quando associado à mudança do local de deposição do sêmen, possibilita a redução do número de espermatozóides necessários à obtenção de prenhez na espécie equina (XAVIER et al., 2010).

As inseminações com baixo número de espermatozóides e um reduzido volume próximo ao sítio de fertilização, podem ser realizadas por histeroscopia ou por meio de pipeta flexível, a qual é guiada por via retal (SAMPER & PLOUGH, 2010).

Samper et al. (2008) demonstraram que as inseminações na extremidade do corno uterino tanto por histeroscopia quanto por meio de pipeta flexível resultaram em taxas de concepção semelhantes. No entanto, no mesmo estudo, o número de espermatozóides utilizados na inseminação por histeroscopia foi significativamente inferior ao da inseminação por pipeta flexível, o que ressalta a possibilidade da utilização de doses inseminantes extremamente reduzidas na inseminação histeroscópica.

Buchanan et al. (1999) compararam as taxas de concepção de grupos de éguas inseminadas com 500×10^6 espermatozóides em 20 ml no corpo do útero, 25×10^6 em 1,0 ml, 5×10^6 em 1,0 ml e 5×10^6 em 0,2 ml depositados na extremidade do corno uterino por meio do desvio da pipeta. Os resultados foram respectivamente de 90%, 57%, 30% e 40%, e conclui-se que a deposição de sêmen no corno uterino pode aumentar a fertilidade ao utilizar um baixo número de espermatozóides em um pequeno volume.

Leão (2006) compararam os resultados obtidos por meio da inseminação convencional e histeroscópica com baixo número de espermatozóides equinos. Foram realizadas inseminações com 10×10^6 espermatozóides móveis na junção útero-tubárica, 10×10^6 espermatozóides móveis no corpo do útero e 400×10^6 espermatozóides móveis no corpo do útero. As taxas de concepção obtidas foram 41,67%, 16,67% e 50%, respectivamente, e demonstrou que a inseminação histeroscópica proporciona bons resultados, mesmo com a utilização de 2,5% da dose convencional de sêmen fresco de garanhões.

A redução da dose inseminante pode parecer contraditória ao se tentar manter um elevado nível de fertilidade, entretanto, várias razões tem motivado veterinários e criadores a implementar esta biotecnologia no manejo reprodutivo dos haras. Dentre as principais razões destacam-se: (a) o aumento da utilização de sêmen criopreservado, o alto custo da dose inseminante e/ou incapacidade de alguns garanhões de não suprirem a demanda de sêmen fresco (SAMPER & PLOUGH, 2010); (b) a utilização de sêmen sexado (CLULOW et al., 2008); (c) a obtenção de resultados satisfatórios ao depositar baixo número de espermatozóides da cauda do epidídimo próximo à papila útero-tubárica (MONTEIRO, 2010); (d) a possibilidade de aumentar a taxa de concepção de garanhões de baixa fertilidade, ao utilizar sêmen congelado (SAMPER et al., 2008); (e) a utilização do sêmen de garanhões idosos com limitada produção espermática diária

(WEEMS & BYERS, 2004); (f) redução da resposta inflamatória após a inseminação artificial (LYLE & FERRER, 2005).

O desenvolvimento de técnicas de colheita e criopreservação de espermatozóides da cauda do epidídimo possibilitou a recuperação do material genético de garanhões de alto valor genético tenham a sua vida reprodutiva interrompida. No entanto, por ser a última chance de resgate do germoplasma destes animais, se faz necessário maximizar a utilização dos espermatozóides epididimários criopreservados por meio da diminuição da concentração espermática na inseminação, com intuito de multiplicar o número de produtos por dose inseminante usual.

Heise et al. (2010) utilizaram 200×10^6 espermatozóides com motilidade progressiva e obtiveram taxas de concepção de 75% quando utilizados após a recuperação, e de 27,8% para os espermatozóides congelados, ambos na presença do plasma seminal.

Morris et al. (2002) demonstraram resultados satisfatórios ao se utilizar baixa dose inseminante de espermatozóides epididimários em inseminações na extremidade do corno uterino de éguas. Foram realizadas 20 inseminações histeroscópicas com aproximadamente 200×10^6 espermatozóides epididimários recém-recuperados e obtiveram nove éguas gestantes, sendo a taxa de concepção de 45%. No mesmo estudo, quando utilizados 200×10^6 espermatozóides epididimários congelados, as taxas de concepção foram menores tanto nas inseminações histeroscópicas quanto nas inseminações convencionais, sendo 18% e 8%, respectivamente. Entretanto, ao reduzir a dose inseminante para 10×10^6 espermatozóides epididimários congelados, a taxa de concepção foi de 29%. Este representa o único estudo com intuito de avaliar a baixa dose inseminante sobre a fertilidade de espermatozóides colhidos da cauda do epidídimo equino.

3.0 – OBJETIVOS

Os objetivos específicos relacionados ao presente trabalho foram:

- a) Avaliar a influência dos meios diluidores com ou sem pentoxifilina sobre os parâmetros espermáticos de espermatozóides recém-recuperados da cauda do epidídimo;

- b) Verificar o efeito dos meios diluidores com ou sem pentoxifilina sobre a congelabilidade dos espermatozóides epididimários;

- c) Avaliar a influência dos meios diluidores sobre os índices de fertilidade de espermatozóides congelados da cauda do epidídimo, ao utilizar baixa dose inseminante.

4.0 – MATERIAL E MÉTODOS

Foram conduzidos dois experimentos complementares de acordo com os objetivos anteriormente propostos. No Experimento I foi avaliado o efeito do meio diluidor utilizado na metodologia do fluxo retrógrado sobre a congelabilidade de espermatozóides da cauda do epidídimo eqüino.

No Experimento II foi avaliada a influência do meio diluidor e da dose inseminante sobre os índices de fertilidade de espermatozóides criopreservados da cauda do epidídimo.

4.1 – Experimento I: Efeito do meio diluidor utilizado na metodologia do fluxo retrógrado sobre a congelabilidade de espermatozóides da cauda do epidídimo eqüino.

4.1.1 – Animais e Local da Pesquisa

As atividades experimentais envolvendo a colheita dos espermatozóides da cauda do epidídimo, avaliação laboratorial, processamento, congelação e estocagem das amostras foram conduzidas no CERAN (Centro de Biotecnologia e Diagnóstico em Reprodução Animal) pertencente ao Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita”, UNESP, Campus de Botucatu/SP.

Para o estudo foram utilizados 29 garanhões da raça Brasileiro de Hipismo (idade entre três e cinco anos) provenientes do Haras Itapuã no município de Arandu-SP.

4.1.2 – Orquiectomia Bilateral

Durante o período pré-operatório os animais foram submetidos a jejum alimentar de 14 horas. O procedimento cirúrgico foi realizado com os garanhões em estação, utilizando 0,5 mg/Kg/i.v de cloridrato de xilazina 10% (Sedazine^{®4}), associado a 0,05 mg/Kg/i.v de cloridrato de acepromazina 1% (Acepran^{®5}) para a sedação dos mesmos. Após 15 minutos da administração dos sedativos, foi realizada a anti-sepsia da região escrotal com polivinilpirrolidona-iodo.

⁴ Fort Dodge Inc. SP, Brasil.

⁵ Univet S/A - Indústria Veterinária. SP, Brasil.

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

Imediatamente após a orquiectomia, o complexo testículo-epidídimo foi armazenado em um saco plástico identificado, contendo 80 mL de Ringer com lactato de sódio. Para evitar o extravasamento de sangue e espermatozóides durante o transporte, o funículo espermático foi ligado com fios de seda, no entanto, o ducto deferente foi ligado separadamente.

Os testículos foram acondicionados em sistemas de refrigeração passiva a 5°C - Botutainer⁶, até a chegada ao Laboratório de Reprodução Animal da FMVZ – UNESP – Botucatu, totalizando em média 6 horas de refrigeração.

4.1.3 – Colheita dos Espermatozóides da Cauda do Epidídimo

A colheita dos espermatozóides da cauda do epidídimo foi realizada pela técnica de fluxo retrógrado relatada por Garde et al. (1994) e Bruemmer et al. (2002) em todos os grupos.

Os testículos foram divididos em dois grupos distintos de acordo com o diluidor utilizado no fluxo retrógrado. Deste modo, o ducto epididimário de um testículo de cada garanhão foi lavado com o meio diluidor sem pentoxifilina – Botu-Sêmen[®] (Controle). Em seguida, o ducto epididimário do testículo contralateral foi lavado com o meio diluidor contendo 7,18 mM de pentoxifilina – Botu-Turbo[®] (PTX). Foram utilizados 40 mL de cada diluidor, ambos previamente aquecidos a 37°C. Após a recuperação, as amostras com ou sem pentoxifilina foram incubadas a 37°C por 15 minutos.

A avaliação da concentração espermática (mm³) foi determinada por meio de câmara hematocitométrica, sob microscopia com contraste de fase⁷ em aumento de 100 a 200 vezes. Para isso, utilizou-se uma alíquota da amostra diluída na proporção de 10 µl da amostra para 990 µl de água destilada (1:100). O número total de espermatozóides recuperados de cada epidídimo foi obtido pela multiplicação da concentração espermática (mm³) pelo volume total da amostra.

⁶ Biotech Ltda, Botucatu, Brasil.

⁷ Micronal S.A., São Paulo

4.1.4 – Congelação dos espermatozóides da cauda do epidídimo

Após a avaliação das células espermáticas, duas amostras de cada grupo experimental (Botu-Sêmen[®] – Controle; Botu-Turbo[®] – 7,18 mM de PTX) foram submetidas à centrifugação a 600xg por 10 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi desprezado e os “pellets” foram ressuspensos com o meio diluidor Botu-Crio^{®1}, na concentração de 160 milhões de espermatozóides viáveis por mL.

O envase foi realizado em palhetas de 0,5 mL, e então as mesmas foram levadas à geladeira de temperatura controlada (Minitub^{®8}) e permaneceram a 5°C por 20 minutos. Posteriormente, as palhetas foram acondicionadas em caixa isotérmica com capacidade de 45 litros, preenchida com nitrogênio líquido até a marca de 3,5 cm de altura. Desta forma, as palhetas ficaram dispostas horizontalmente a 6,0 cm do nível do nitrogênio líquido por 20 minutos e, após este período, foram imersas no mesmo (PAPA et al., 2010).

4.1.5 – Avaliação Laboratorial das Amostras Recuperadas da Cauda do Epidídimo

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

Os espermatozóides colhidos da cauda do epidídimo foram avaliados pelo método computadorizado CASA (HTM-IVOS 12⁹) imediatamente após a recuperação, 15 minutos após a incubação, após a ressuspensão com diluidor de congelação e após descongelação a 46°C por 20 segundos.

Os parâmetros de movimento espermático avaliados no presente estudo, correspondem, segundo Arruda et al. (2004): motilidade total (MoT, %), representada pela soma de todas as células móveis; motilidade progressiva (MP, %) é porcentagem de células que apresentam movimento progressivo; velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$) é a velocidade média ininterrupta do trajeto da célula; velocidade linear progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$) corresponde a velocidade média percorrida em linha reta entre os pontos

⁸ Minitub do Brasil LTDA.

⁹ Hamilton Thorne Research, USA.

inicial e final do trajeto; velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$) corresponde a velocidade média mensurada de ponto a ponto do trajeto percorrido pela célula espermática; amplitude do deslocamento lateral de cabeça (ALH, μm) é a largura média da oscilação da cabeça espermática ao longo do movimento; frequência de batimentos (BCF; Hz) é frequência com que a cabeça do espermatozóide move-se para trás e para frente durante um trajeto percorrido; retilinearidade (STR, %) corresponde ao valor médio da proporção entre VSL/VAP x 100; linearidade do movimento (LIN, %) é o valor médio da proporção entre VSL/VAP x 100; e espermatozóides rápidos (RAP; %).

A determinação da integridade da membrana plasmática (IMP, %) foi realizada somente nas amostras recém-recuperadas e após a descongelação à 46°C por 20 segundos. Foi utilizada a combinação das sondas fluorescentes diacetato de carboxifluoresceína e iodeto de propídeo, segundo Harrison & Vickers (1990). Para tanto, retirou-se uma alíquota de $5\ \mu\text{L}$ de sêmen de cada amostra avaliada, sendo adicionada a solução de trabalho fluorescente, composta por $96\ \mu\text{L}$ de citrato de sódio 2,94%, $10\ \mu\text{L}$ de formol salino tamponado, $10\ \mu\text{L}$ de iodeto de propídeo e $20\ \mu\text{L}$ de carboxifluoresceína.

As amostras foram avaliadas sob lâmina e lamínula em aumento de 400x por microscopia de epifluorescência, permitindo a diferenciação das células portadoras de membrana plasmática íntegra (coloração verde devida à marcação pela carboxifluoresceína) ou lesada (exibindo coloração vermelha caracterizando a marcação pelo iodeto de propídeo, sonda exclusivamente permeável às células portadoras de membrana plasmática desestruturada). Para cada amostra avaliada, foram contadas 100 células espermáticas.

Adicionalmente, a avaliação da fosforilação da proteína tirosina foi realizada como indicador da capacitação espermática, somente nas amostras descongeladas. A técnica foi realizada por meio da reação de imunofluorescência uma vez que, por serem amostras congeladas em meio diluidor com gema de ovo, a avaliação por imunoblotting não é factível. A metodologia utilizada foi a mesma descrita por Pommer et al. (2003). Deste modo, para a avaliação da capacitação, as amostras descongeladas foram fixadas em 2% de paraformaldeído por 10 minutos, lavadas e ressuspensas em solução de DPBS com 0,1% de Triton X-100 por 10 minutos para permeabilizar a membrana plasmática. Em seguida, as amostras foram incubadas por 10 minutos em solução bloqueadora (DPBS com 5% de BSA) e novamente lavadas e ressuspensas em DPBS. As amostras preparadas foram incubadas em anticorpo monoclonal anti-fosfotirosina

(4G10 mAb) na concentração de 1:500 durante uma noite a 4°C. Após este período, as amostras foram novamente lavadas em DPBS e incubadas em conjugado fluorescente (fluorescein-conjugated goat anti-mouse Fab IgG) na concentração de 1:350 por 1 hora a temperatura ambiente em recipiente escuro e, em seguida, lavadas e ressuspendidas em DPBS para avaliação em microscópio de epi-fluorescência. Nesta avaliação foram observados quatro padrões de fluorescência: a) banda equatorial, b) cauda, c) banda equatorial e cauda e d) nenhum. Para análise deste teste, foram considerados dois grupos: Cauda (padrões b e c) - POSITIVO e Outros (padrões a e d) - NEGATIVO.

4.1.6 – Análise Estatística

Para as análises estatísticas foi utilizado o software Graphpad Instat[®] 3.06, realizando-se o teste “T de Student” para as variáveis que apresentaram distribuição normal, assumindo-se $p < 0,05$ como nível de significância.

4.2 – Experimento II: Influência do meio diluidor e da dose inseminante sobre os índices de fertilidade de espermatozoides criopreservados da cauda do epidídimo.

4.2.1 – Animais e Local da Pesquisa

Na segunda etapa experimental, as atividades experimentais envolvendo a colheita dos espermatozoides da cauda do epidídimo, avaliação laboratorial, processamento, congelamento e estocagem das amostras foram conduzidas no CERAN (Centro de Biotecnologia e Diagnóstico em Reprodução Animal) pertencente ao Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita”, UNESP, Campus de Botucatu/SP.

Para o estudo foram utilizados dois garanhões (idade entre dois a três anos), sendo um animal da raça Brasileiro de Hipismo, e outro da raça Quarto de Milha, provenientes de propriedades localizadas no município de Boituva-SP.

Os animais foram previamente avaliados por exame andrológico. O teste de fertilidade foi realizado em 16 éguas com idade entre 4 e 15 anos, pertencentes ao Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da FMVZ/UNESP - Botucatu.

4.2.2 – Colheita e Congelação dos Espermatozóides da Cauda do Epidídimo

Os garanhões foram submetidos à orquiectomia bilateral conforme descrito no experimento I. Os testículos foram acondicionados em sistemas de refrigeração passiva a 5°C - Botutainer[®], até a chegada ao Laboratório de Reprodução Animal da FMVZ – UNESP – Botucatu, totalizando em média 6 horas de refrigeração.

A colheita dos espermatozóides da cauda do epidídimo foi realizada pela técnica de fluxo retrógrado relatada por Garde et al. (1994) e Bruemmer et al. (2002). Os meios diluidores sem (Botu-Sêmen[®] – Controle) ou com pentoxifilina (Botu-Turbo[®] – PTX) foram utilizados no fluxo retrógrado, uma vez que ambos demonstraram resultados similares após a descongelação das amostras no Experimento I.

Visando a exclusão de possíveis efeitos individuais relacionados aos garanhões utilizados no experimento, optou-se pela realização de um “pool de espermatozóides”, evitando-se dessa forma a influência do reprodutor sobre os índices médios de fertilidade.

Deste modo, os espermatozóides colhidos da cauda do epidídimo dos dois garanhões selecionados foram misturados integralmente executando-se a mesma metodologia de congelação apresentada no item 4.1.4., entretanto, os “pellets” foram ressuspensos com o meio diluidor Botu-Crio[®] na concentração de 200 milhões de espermatozóides viáveis por mL.

4.2.3 – Avaliação Laboratorial das Amostras Recuperadas da Cauda do Epidídimo

Devido à similaridade da metodologia utilizada no Experimento I, as amostras do “pool de espermatozóides” foram avaliadas quanto aos padrões de movimento espermático pela técnica CASA, integridade de membrana plasmática e fosforilação da tirosina, sendo observadas as mesmas variáveis para cada análise conforme descrito no item 4.1.5.

4.2.4 – Teste de Fertilidade

Para a realização do teste de fertilidade foram utilizadas 16 éguas. Cada uma delas foi submetida à inseminação artificial por três ciclos, totalizando 48 ciclos. Cada égua foi inseminada com os seguintes grupos: 800×10^6 espermatozóides recuperados com o meio diluidor sem pentoxifilina (800 Controle), 100×10^6 espermatozóides

recuperados com diluidor sem pentoxifilina (100 Controle) e 100×10^6 espermatozoides recuperados com o diluidor com pentoxifilina (100 PTX).

As éguas foram distribuídas aleatoriamente e utilizadas nos três grupos testados (800 Controle, 100 Controle, 100 PTX). Os animais foram monitorados por exame ultra-sonográfico transretal e depois da constatação de um folículo com 35 mm, a ovulação foi induzida com 1 mg de Acetato de Deslorelina. Após 34 horas da administração do indutor de ovulação, as éguas foram monitoradas por ultrassonografia a cada 6 horas até a detecção da ovulação. Neste momento, as fêmeas foram inseminadas de acordo com o grupo inseminante.

Para a realização das inseminações, as palhetas foram descongeladas a 46°C por 20 segundos, introduzidas em uma pipeta flexível¹⁰ e com auxílio de um mandril, os espermatozoides foram depositados na extremidade do corno ipsilateral à ovulação.

O diagnóstico de gestação foi realizado entre 12 e 15 dias após a ovulação, com o auxílio do ultra-som (Pie Medical Falcon 100 Vet)¹¹.

4.2.5 – Análise Estatística

Os resultados de concepção foram analisados por meio teste exato de Fisher por meio do programa Graphpad InStat[®] 3.06, assumindo-se $p < 0,05$ como nível de significância.

¹⁰ Minitub do Brasil Ltda, Porto Alegre-RS, Brasil

¹¹ Nutricel, Ltda.

5.0 – RESULTADOS

5.1 – Experimento I: Efeito do meio diluidor utilizado no fluxo retrógrado sobre a congelabilidade de espermatozóides da cauda do epidídimo eqüino.

A média de espermatozóides recuperados da cauda do epidídimo por meio da técnica de fluxo retrógrado foi de aproximadamente $14,38 \times 10^9$ de espermatozóides/epidídimo.

Os resultados apresentados para cada uma das variáveis do movimento espermático e avaliação da fosforilação da tirosina, de acordo com o meio diluidor utilizado no fluxo retrógrado após a recuperação, incubação à 37°C/15 minutos, centrifugação e ressuspensão com o meio diluidor de congelação, e descongelação encontram-se sumarizados nas TABELAS-1 a 7.

Os dados apresentados na TABELA 1 e 2 demonstram diferenças significativas para os valores médios de motilidade total, motilidade progressiva, velocidade de trajeto, velocidade progressiva, velocidade curvilínea, e porcentagem de espermatozóides rápidos de acordo com o diluidor utilizado no fluxo retrógrado, nos momentos pós-recuperação ou pós-incubação à 37°C por 15 minutos. Entretanto, somente nas amostras recém-recuperadas com pentoxifilina (TABELA 1), foi observada diferença significativa na frequência de batimento flagelar.

Não houve diferença significativa na integridade de membrana plasmática nas amostras recém-recuperadas (TABELA 1) entre os diluidores utilizados.

Após a centrifugação e ressuspensão com o diluidor de congelação (TABELA 3), diferenças significativas foram observadas somente na motilidade progressiva e na linearidade do movimento das amostras analisadas.

Não foram observadas diferenças significativas para as variáveis do movimento espermático, integridade de membrana plasmática e fosforilação da tirosina após a descongelação das amostras sem ou com pentoxifilina (TABELA 4 e 5).

Ao analisar os meios diluidores individualmente, de acordo com os momentos, foram observadas diferenças significativas nos resultados das variáveis do movimento espermático entre as amostras recém-recuperadas, após a incubação à 37°C por 15 minutos, centrifugação e ressuspensão em meio diluidor de congelação e após a descongelação das amostras sem ou com pentoxifilina (TABELA 6 e 7).

Não foram observadas diferenças significativas entre as amostras sem ou com pentoxifilina após a descongelação. Entretanto, ao analisar os meios diluidores

separadamente, diferenças significativas foram encontradas entre as amostras recém-recuperadas e após a descongelação (FIGURA 4).

TABELA – 1: Valores médios e desvios padrão da motilidade total (MoT; %), progressiva (MP; %), velocidade de trajeto (VAP; $\mu\text{m/s}$), velocidade linear progressiva (VSL; $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilinear (VCL; $\mu\text{m/s}$), amplitude do deslocamento lateral de cabeça (ALH; μm), frequência de batimentos (BCF; Hz), retilinearidade (STR; %), linearidade do movimento (LIN; %) e espermatozoides rápidos (Rap; %) e integridade de membrana plasmática (IMP; %) das amostras recém-recuperadas em diluidor sem (Botu-Sêmen[®] – Controle) ou com pentoxifilina (Botu-Turbo[®] – PTX).

<i>Variáveis</i>	<i>Controle</i>	<i>PTX</i>	<i>P-valor</i>	<i>Resultados</i>
MoT (%)	17,14 \pm 14,03 ^a	53,33 \pm 21,92 ^b	<0,0001	SD
MP (%)	5,55 \pm 6,04 ^a	20,62 \pm 11,26 ^b	<0,0001	SD
VAP ($\mu\text{m/s}$)	76,79 \pm 9,94 ^a	103,76 \pm 16,79 ^b	<0,0001	SD
VSL ($\mu\text{m/s}$)	60,31 \pm 11,32 ^a	77,03 \pm 11,45 ^b	<0,0001	SD
VCL ($\mu\text{m/s}$)	150,52 \pm 25,03 ^a	194,9 \pm 30,19 ^b	<0,0001	SD
ALH (μm)	7,12 \pm 2,22	9,96 \pm 12,99	0,2518	NS
BCF (Hz)	26,24 \pm 5,8 ^a	28,76 \pm 3,16 ^b	0,0447	SD
STR (%)	74,86 \pm 4,43	73,93 \pm 4,21	0,4154	NS
LIN (%)	43,17 \pm 9,22	40,19 \pm 2,98	0,1913	NS
Rap (%)	9,45 \pm 8,91 ^a	43,86 \pm 22,19 ^b	<0,0001	SD
IMP (%)	73,79 \pm 13,52	76,07 \pm 12,98	0,5158	NS

Valores seguidos por letras diferentes (a,b) dentro da mesma linha denotam as diferenças estatísticas ($p < 0,05$). SD = diferença significativa; NS= sem diferença estatística.

TABELA – 2: Valores médios e desvios padrão da motilidade total (MoT; %), progressiva (MP; %), velocidade de trajeto (VAP; $\mu\text{m/s}$), velocidade linear progressiva (VSL; $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilinear (VCL; $\mu\text{m/s}$), amplitude do deslocamento lateral de cabeça (ALH; μm), frequência de batimentos (BCF; Hz), retilinearidade (STR; %), linearidade do movimento (LIN; %) e espermatozoides rápidos (Rap; %) das amostras incubadas à 37°C por 15 minutos em diluidor sem (Botu-Sêmen® – Controle) ou com pentoxifilina (Botu-Turbo® – PTX).

<i>Variáveis</i>	<i>Controle</i>	<i>PTX</i>	<i>P-valor</i>	<i>Resultados</i>
MoT (%)	44,10 \pm 26,20 ^a	66,93 \pm 19,24 ^b	0,0004	SD
MP (%)	14,17 \pm 11,37 ^a	24,48 \pm 10,92 ^b	0,0009	SD
VAP ($\mu\text{m/s}$)	88,62 \pm 15,90 ^a	104,79 \pm 15,68 ^b	0,0003	SD
VSL ($\mu\text{m/s}$)	64,72 \pm 11,53 ^a	77,72 \pm 11,16 ^b	<0,0001	SD
VCL ($\mu\text{m/s}$)	171,90 \pm 31,26 ^a	200,66 \pm 28,31 ^b	0,0005	SD
ALH (μm)	7,59 \pm 1,11	7,88 \pm 25,79	0,2240	NS
BCF (Hz)	25,79 \pm 4,78	27,07 \pm 3,68	0,2600	NS
STR (%)	73,07 \pm 4,57	72,86 \pm 4,36	0,8605	NS
LIN (%)	39,31 \pm 3,63	39,66 \pm 3,82	0,7257	NS
Rap (%)	32,52 \pm 23,39 ^a	56,31 \pm 21,84 ^b	0,0002	SD

Valores seguidos por letras diferentes (a,b) dentro da mesma linha denotam as diferenças estatísticas ($p < 0,05$). SD = diferença significativa; NS= sem diferença estatística.

TABELA – 3: Valores médios e desvios padrão da motilidade total (MoT; %), progressiva (MP; %), velocidade de trajeto (VAP; $\mu\text{m/s}$), velocidade linear progressiva (VSL; $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilinear (VCL; $\mu\text{m/s}$), amplitude do deslocamento lateral de cabeça (ALH; μm), frequência de batimentos (BCF; Hz), retilinearidade (STR; %), linearidade do movimento (LIN; %) e espermatozoides rápidos (Rap; %) das amostras recuperadas em diluidor sem (Botu-Sêmen[®] – Controle) ou com pentoxifilina (Botu-Turbo[®] – PTX), após a centrifugação e ressuspensão com o diluidor de congelamento Botu-Crio[®].

<i>Variáveis</i>	<i>Controle</i>	<i>PTX</i>	<i>P-valor</i>	<i>Resultados</i>
MoT (%)	82,00 \pm 8,49	84,45 \pm 7,88	0,2599	NS
MP (%)	31,93 \pm 8,31 ^a	37,52 \pm 8,24 ^b	0,0129	SD
VAP ($\mu\text{m/s}$)	106,62 \pm 10,95	107,86 \pm 10,78	0,6652	NS
VSL ($\mu\text{m/s}$)	78,07 \pm 7,59	81,59 \pm 7,56	0,0824	NS
VCL ($\mu\text{m/s}$)	202,38 \pm 20,50	202,34 \pm 19,62	0,9948	NS
ALH (μm)	12,08 \pm 16,9	7,32 \pm 0,65	0,1845	NS
BCF (Hz)	27,59 \pm 3,78	29,48 \pm 3,55	0,1047	NS
STR (%)	72,72 \pm 4,21	73,90 \pm 6,54	0,4202	NS
LIN (%)	39,14 \pm 3,14 ^a	42,62 \pm 6,84 ^b	0,0157	SD
Rap (%)	70,52 \pm 12,97	76,07 \pm 10,78	0,0817	NS

Valores seguidos por letras diferentes (a,b) dentro da mesma linha denotam as diferenças estatísticas ($p < 0,05$). SD = diferença significativa; NS= sem diferença estatística.

TABELA – 4: Valores médios e desvios padrão da motilidade total (MoT; %), progressiva (MP; %), velocidade de trajeto (VAP; $\mu\text{m/s}$), velocidade linear progressiva (VSL; $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilinear (VCL; $\mu\text{m/s}$), amplitude do deslocamento lateral de cabeça (ALH; μm), frequência de batimentos (BCF; Hz), retilinearidade (STR; %), linearidade do movimento (LIN; %), espermatozóides rápidos (Rap; %) e integridade de membrana plasmática (IMP; %) das amostras recuperadas em diluidor sem (Botu-Sêmen[®] – Controle) ou com pentoxifilina (Botu-Turbo[®] – PTX) e criopreservadas com o diluidor de congelação Botu-Crio[®] após a descongelação à 46°C por 20 segundos.

<i>Variáveis</i>	<i>Controle</i>	<i>PTX</i>	<i>P-valor</i>	<i>Resultados</i>
MoT (%)	63,07 ± 14,88	69,72 ± 14,02	0,0851	NS
MP (%)	27,03 ± 12,77	30,38 ± 11,91	0,3068	NS
VAP ($\mu\text{m/s}$)	85,76 ± 12,89	87,69 ± 12,14	0,5593	NS
VSL ($\mu\text{m/s}$)	68,59 ± 9,52	70,34 ± 8,37	0,4580	NS
VCL ($\mu\text{m/s}$)	158,31 ± 20,70	160,59 ± 20,36	0,6745	NS
ALH (μm)	6,31 ± 0,74	6,21 ± 0,71	0,6008	NS
BCF (Hz)	34,79 ± 4,20	35,38 ± 3,88	0,5827	NS
STR (%)	79,79 ± 3,72	80,38 ± 4,02	0,5666	NS
LIN (%)	44,66 ± 3,37	45,31 ± 3,54	0,4733	NS
Rap (%)	41,86 ± 19,29	48,21 ± 18,84	0,2103	NS
IMP (%)	38,00 ± 9,55	37,76 ± 10,09	0,8627	NS

Valores seguidos por letras diferentes (a,b) dentro da mesma linha denotam as diferenças estatísticas ($p < 0,05$). SD = diferença significativa; NS= sem diferença estatística.

TABELA – 5: Valores médios e desvios da avaliação da fosforilação da tirosina das amostras recuperadas em diluidor sem (Botu-Sêmen[®] – Controle) ou com pentoxifilina (Botu-Turbo[®] – PTX) e criopreservadas com o diluidor de congelação Botu-Crio[®].

<i>Variável</i>	<i>Controle</i>	<i>PTX</i>	<i>P-valor</i>	<i>Resultados</i>
Fosforilação da Tirosina (%)	37,14 ± 17,20	43,66 ± 20,99	0,2012	NS

Valores seguidos por letras diferentes (a,b) dentro da mesma linha denotam as diferenças estatísticas ($p < 0,05$). SD = diferença significativa; NS= sem diferença estatística.

TABELA – 6: Valores médios e desvios padrão da motilidade total (MoT; %), progressiva (MP; %), velocidade de trajeto (VAP; $\mu\text{m/s}$), velocidade linear progressiva (VSL; $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilinear (VCL; $\mu\text{m/s}$), amplitude do deslocamento lateral de cabeça (ALH; μm), frequência de batimentos (BCF; Hz), retilinearidade (STR; %), linearidade do movimento (LIN; %) e espermatozoides rápidos (Rap; %) das amostras após a recuperação (T0) e incubação à 37°C por 15 minutos (T15) em diluidor sem pentoxifilina (Botu-Sêmen® – Controle), após a centrifugação e ressuspensão em Botu-Crio® e descongelação à 46°C por 20 segundos.

Controle				
<i>Variáveis</i>	T0	T15	Pós-ressuspensão	Pós-descongelação
MoT (%)	17,14 ± 14,03 ^a	44,10 ± 26,20 ^b	82,00 ± 8,49 ^c	63,07 ± 14,88 ^d
MP (%)	5,55 ± 6,04 ^a	14,17 ± 11,37 ^b	31,93 ± 8,31 ^c	27,03 ± 12,77 ^c
VAP ($\mu\text{m/s}$)	76,79 ± 9,94 ^a	88,62 ± 15,90 ^b	106,62 ± 10,95 ^c	85,76 ± 12,89 ^{bd}
VSL ($\mu\text{m/s}$)	60,31 ± 11,32 ^a	64,72 ± 11,53 ^{ac}	78,07 ± 7,59 ^b	68,59 ± 9,52 ^c
VCL ($\mu\text{m/s}$)	150,52 ± 25,03 ^a	171,90 ± 31,26 ^b	202,38 ± 20,50 ^c	158,31 ± 20,70 ^{ab}
ALH (μm)	7,12 ± 2,22 ^{ab}	7,59 ± 1,11 ^a	12,08 ± 16,9 ^a	6,31 ± 0,74 ^b
BCF (Hz)	26,24 ± 5,8 ^a	25,79 ± 4,78 ^a	27,59 ± 3,78 ^a	34,79 ± 4,20 ^b
STR (%)	74,86 ± 4,43 ^a	73,07 ± 4,57 ^a	72,72 ± 4,21 ^a	79,79 ± 3,72 ^b
LIN (%)	43,17 ± 9,22 ^a	39,31 ± 3,63 ^b	39,14 ± 3,14 ^b	44,66 ± 3,37 ^a
Rap (%)	9,45 ± 8,91 ^a	32,52 ± 23,39 ^b	70,52 ± 12,97 ^c	41,86 ± 19,29 ^{bd}

Valores seguidos por letras diferentes (a,b,c,d) dentro da mesma linha denotam as diferenças estatísticas ($p < 0,05$). SD = diferença significativa; NS= sem diferença estatística.

TABELA – 7: Valores médios e desvios padrão da motilidade total (MoT; %), progressiva (MP; %), velocidade de trajeto (VAP; $\mu\text{m/s}$), velocidade linear progressiva (VSL; $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilinear (VCL; $\mu\text{m/s}$), amplitude do deslocamento lateral de cabeça (ALH; μm), frequência de batimentos (BCF; Hz), retilinearidade (STR; %), linearidade do movimento (LIN; %) e espermatozoides rápidos (Rap; %) das amostras após a recuperação (T0) e incubação à 37°C por 15 minutos (T15) em diluidor com pentoxifilina (Botu-Turbo[®]) após a centrifugação e ressuspensão em Botu-Crio[®] e descongelamento à 46°C por 20 segundos.

7,18 mM Pentoxifilina				
Variáveis	T0	T15	Pós-ressuspensão	Pós-descongelamento
MoT (%)	53,33 \pm 21,92 ^a	66,93 \pm 19,24 ^b	84,45 \pm 7,88 ^c	69,72 \pm 14,02 ^{bd}
MP (%)	20,62 \pm 11,26 ^a	24,48 \pm 10,92 ^{ac}	37,52 \pm 8,24 ^b	30,38 \pm 11,91 ^{bc}
VAP ($\mu\text{m/s}$)	103,76 \pm 16,79 ^a	104,79 \pm 15,68 ^a	107,86 \pm 10,78 ^a	87,69 \pm 12,14 ^b
VSL ($\mu\text{m/s}$)	77,03 \pm 11,45 ^{abc}	77,72 \pm 11,16 ^{ab}	81,59 \pm 7,56 ^a	70,34 \pm 8,37 ^c
VCL ($\mu\text{m/s}$)	194,9 \pm 30,19 ^a	200,66 \pm 28,31 ^a	202,34 \pm 19,62 ^a	160,59 \pm 20,36 ^b
ALH (μm)	9,96 \pm 12,99 ^a	7,88 \pm 25,79 ^a	7,32 \pm 0,65 ^a	6,21 \pm 0,71 ^b
BCF (Hz)	28,76 \pm 3,16 ^a	27,07 \pm 3,68 ^a	29,48 \pm 3,55 ^a	35,38 \pm 3,88 ^b
STR (%)	73,93 \pm 4,21 ^a	72,86 \pm 4,36 ^a	73,90 \pm 6,54 ^a	80,38 \pm 4,02 ^b
LIN (%)	40,19 \pm 2,98 ^a	39,66 \pm 3,82 ^a	42,62 \pm 6,84 ^{ab}	45,31 \pm 3,54 ^b
Rap (%)	43,86 \pm 22,19 ^a	56,31 \pm 21,84 ^a	76,07 \pm 10,78 ^b	48,21 \pm 18,84 ^a

Valores seguidos por letras diferentes (a,b,c,d) dentro da mesma linha denotam as diferenças estatísticas ($p < 0,05$). SD = diferença significativa; NS= sem diferença estatística.

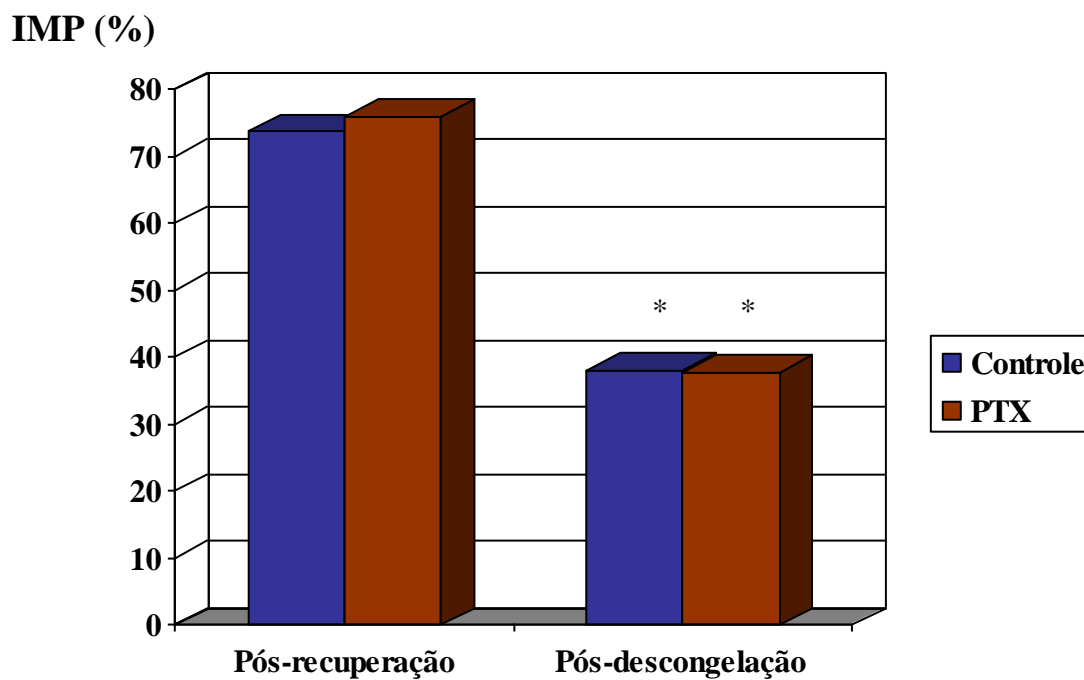


FIGURA – 4: Integridade de membrana plasmática (%) das amostras após a recuperação ou após a descongelação em diluidor sem (Controle) ou com 7,18 mM de pentoxifilina (PTX). * Indicam diferenças significativas entre os tratamentos Controle e PTX nos diferentes momentos ($p < 0,05$).

5.2. Experimento II: Influência do meio diluidor e da dose inseminante sobre os índices de fertilidade de espermatozóides criopreservados da cauda do epidídimo.

5.2.1 – Avaliação Laboratorial do “Pool de Espermatozóides” Recuperados da Cauda do Epidídimo

A média de espermatozóides recuperados da cauda do epidídimo pela técnica de fluxo retrógrado obtido no Experimento II foi de aproximadamente $11,12 \times 10^9$ de espermatozóides/epidídimo.

Os resultados descritivos referentes a avaliação *in vitro* das amostras recuperadas da cauda do epidídimo destinadas às inseminações artificiais (“pool de espermatozóides”) encontram-se sumarizados nas TABELAS 8 a 10.

A integridade de membrana foi de 20,7%, para a amostra sem pentoxifilina e 23,8% para a amostra com pentoxifilina.

TABELA – 8: Valores da motilidade total (MoT; %), progressiva (MP; %), velocidade de trajeto (VAP; $\mu\text{m/s}$), velocidade linear progressiva (VSL; $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL; $\mu\text{m/s}$), amplitude do deslocamento lateral de cabeça (ALH; μm), frequência de batimentos (BCF; Hz), retilinearidade (STR; %), linearidade do movimento (LIN; %) e espermatozoides rápidos (Rap; %) para o “pool de espermatozoides” recém-recuperado (T0) em diluidor sem (Botu-Sêmen[®] – Controle) ou com pentoxifilina (Botu-Turbo[®] – PTX) e após a incubação à 37°C por 15 minutos (T15).

<i>Variáveis</i>	T0		T15	
	<i>Pool Controle</i>	<i>Pool PTX</i>	<i>Pool Controle</i>	<i>Pool PTX</i>
MoT (%)	30	78	63	79
MP (%)	12	37	24	38
VAP ($\mu\text{m/s}$)	94	129	113	129
VSL ($\mu\text{m/s}$)	76	100	84	100
VCL ($\mu\text{m/s}$)	170	228	206	227
ALH (μm)	6,5	7,6	7,7	7,5
BCF (Hz)	30	32	29	31
STR (%)	79	75	74	75
LIN (%)	45	44	41	43
Rap (%)	18	69	50	70

TABELA – 9: Valores da motilidade total (MoT; %), progressiva (MP; %), velocidade de trajeto (VAP; $\mu\text{m/s}$), velocidade linear progressiva (VSL; $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL; $\mu\text{m/s}$), amplitude do deslocamento lateral de cabeça (ALH; μm), frequência de batimentos (BCF; Hz), retilinearidade (STR; %), linearidade do movimento (LIN; %) e espermatozoides rápidos (Rap; %) para o “pool de espermatozoides” recuperados da cauda do epidídimo em diluidor sem (Botu-Sêmen[®] – Controle) ou com pentoxifilina (Botu-Turbo[®] – PTX) após a centrifugação e ressuspensão com o diluidor de congelamento Botu-Crio[®] e após a descongelação.

<i>Variáveis</i>	Pós-ressuspensão		Pós-descongelação	
	<i>Pool Controle</i>	<i>Pool PTX</i>	<i>Pool Controle</i>	<i>Pool PTX</i>
MoT (%)	84	86	80	74
MP (%)	41	39	33	40
VAP ($\mu\text{m/s}$)	104	113	84	86
VSL ($\mu\text{m/s}$)	80	84	68	72
VCL ($\mu\text{m/s}$)	193	211	154	159
ALH (μm)	6,7	7,2	6,2	6,2
BCF (Hz)	32	31	33	34
STR (%)	76	75	79	83
LIN (%)	43	42	45	46
Rap (%)	75	78	53	56

TABELA – 10: Valores médios e desvios da avaliação da fosforilação da tirosina das amostras recuperadas em diluidor sem (Botu-Sêmen[®] – Controle) ou com pentoxifilina (Botu-Turbo[®] – PTX) e criopreservadas com o diluidor de congelamento Botu-Crio[®].

<i>Variável</i>	<i>Controle</i>	<i>PTX</i>
Fosforilação da Tirosina (%)	10	17

5.2.2 – Avaliação dos Índices de Fertilidade

O índice de concepção para as éguas inseminadas nos grupos 800 Controle, 100 Controle e 100 PTX foi de 68% (11/16), 31,25% (5/16) e 50% (8/16), respectivamente. Desta forma, foi observada tendência ($p=0,07$) para os índices de concepção das éguas inseminadas nos grupos 800 Controle e 100 PTX, demonstrando similaridade entre as diferentes doses inseminantes, de acordo com o meio diluidor utilizado (TABELA 11).

Foi observada influência da dose inseminante sobre os índices de concepção ao considerar os três grupos inseminantes; 800 Controle, 100 Controle e 100 PTX ($p<0,05$; TABELA 12).

Os índices de concepção para éguas inseminadas em função da dose inseminante, independente do diluidor utilizado na recuperação dos espermatozóides da cauda do epidídimo foi de 68% (11/16) para o grupo inseminado com 800×10^6 de espermatozóides e 40,62 % (13/32) no grupo inseminado com 100×10^6 de espermatozóides. Não foram encontradas diferenças significativas entre as doses inseminantes utilizadas no presente experimento, independente do meio diluidor utilizado (TABELA 13).

Da mesma forma, não foram encontradas diferenças significativas nos índices de concepção em função do meio diluidor utilizado, independente da dose inseminante (TABELA 14), onde os índices de concepção foram de 50% (16/32) para o meio diluidor sem pentoxifilina e 50% (8/16) para o meio diluidor com pentoxifilina.

TABELA – 11: Índices de concepção para éguas inseminadas de acordo com o meio diluidor utilizado na recuperação dos espermatozóides da cauda do epidídimo e da dose inseminante.

Tratamento	Dose Inseminante	N	Prenhez (n)	Concepção (%)
Controle	800 x 10 ⁶ sptz	16	11	68,75 ^a
Controle	100 x 10 ⁶ sptz	16	5	31,25 ^b
PTX	100 x 10 ⁶ sptz	16	8	50 ^{ab}

Valores seguidos por letras diferentes (a,b) dentro da mesma coluna denotam as diferenças estatísticas (p=0,07). PTX: pentoxifilina; Sptz: espermatozóides.

TABELA – 12: Efeito das variáveis meio diluidor e dose inseminante sobre os índices de concepção.

Parâmetros	P-valor	Resultados
Meio diluidor	0,2837	NS
Dose Inseminante	0,0387	SD

SD = diferença significativa; NS= sem diferença estatística.

TABELA – 13: Índices de concepção para éguas inseminadas em função da dose inseminante, independente do diluidor utilizado na recuperação dos espermatozóides da cauda do epidídimo.

Tratamento	N	Prenhez (n)	Concepção (%)
800 x 10 ⁶ sptz	16	11	68,75
100 x 10 ⁶ sptz	32	13	40,62

Valores seguidos por letras diferentes (a,b) dentro da mesma coluna denotam as diferenças estatísticas (p<0,05). Sptz: espermatozóides.

TABELA – 14: Índices de concepção para éguas inseminadas em função do meio diluidor utilizado na recuperação dos espermatozóides da cauda do epidídimo, independente da dose inseminante aplicada.

Tratamento	N	Prenhez (n)	Concepção (%)
Controle	32	16	50
Pentoxifilina	16	8	50

Valores seguidos por letras diferentes (a,b) dentro da mesma coluna denotam as diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

6.0 – DISCUSSÃO

6.1 – Experimento I

No Experimento I foi avaliado o efeito do meio diluidor utilizado na metodologia do fluxo retrógrado sobre a congelabilidade de espermatozóides da cauda do epidídimo equino.

A técnica do fluxo retrógrado mostrou-se eficaz na recuperação dos espermatozóides da cauda do epidídimo ao obtermos a concentração de aproximadamente $14,38 \times 10^9$ de espermatozóides/epidídimo. A grande quantidade de células espermáticas recuperadas se deve a função de reservatório espermático exercida pela cauda do epidídimo (COSENTINO & COCKETT, 1986). Durante a ejaculação, apenas parte destas células presentes no reservatório espermático é liberada juntamente com o produto das glândulas acessórias, recuperando-se em média a concentração de 5×10^9 de espermatozóides/ejaculado (SQUIRES et al., 1982).

Diferentemente dos espermatozóides do ejaculado, as células espermáticas recuperadas da cauda do epidídimo encontram-se em sua maioria imóveis após a colheita, como demonstrado na TABELA 1, isto devido ao fato de que estas células permanecem quiescentes nos fluidos epididimários (TURNER & REICH, 1985).

No entanto, as amostras recuperadas em meio diluidor com pentoxifilina diferiram significativamente nas variáveis MoT, MP, VAP, VSL, VCL e Rap, tanto após a recuperação quanto após a incubação à 37°C por 15 minutos, provavelmente pelo aumento dos níveis intra-espermáticos de AMPc promovido pela pentoxifilina, concordando com resultados de Guasti et al. (2009).

De acordo com relatos na literatura, o desenvolvimento da motilidade está associado ao aumento dos níveis intra-espermáticos de pH, AMPc e íons cálcio, mediadores responsáveis pela ativação da cinética espermática (HOSKINS et al., 1978; KANN & SERRES, 1980), assim como a remoção de proteínas imobilizadoras que aumentam a viscosidade do fluido epididimário e dificultam a movimentação das células espermáticas (USSELMANN & CONE, 1983). Deste modo, é possível que a metodologia do fluxo retrógrado utilizada no presente estudo proporcionou a diluição das células espermáticas e a dispersão dos fatores imobilizadores do fluido epididimário, que juntamente aos efeitos da pentoxifilina, causaram o aumento nos padrões de movimento espermático, como descrito na TABELA 1 e 2.

Resultados similares foram observados por Goulart et al. (2004), onde foi adicionado ao sêmen equino um meio diluidor a base de leite desnatado contendo 3,6 mM de pentoxifilina. Foi demonstrado um incremento na cinética espermática nas variáveis MoT, MP, VSL e VAP das amostras com pentoxifilina incubadas à 37°C por 30, 60 e 120 minutos, previamente a refrigeração por 48 horas.

No entanto, Hassanpour et al. (2010) adicionaram um meio diluidor contendo 10 mM de pentoxifilina aos espermatozóides colhidos da cauda do epidídimo de carneiros e observaram um decréscimo nas variáveis MP, VSL, VAP, ALH e LIN após a incubação por 60 minutos à 38°C. Tais resultados discordam com os resultados descritos na TABELA 2, possivelmente o menor tempo de incubação utilizado em nosso estudo (15 minutos) preservou a cinética espermática das células.

Em relação à variável frequência de batimento (BCF, Hz) houve diferença significativa somente nas amostras epididimárias recém-recuperadas em meio diluidor com pentoxifilina. Desta forma, o aumento intra-espermático de AMPc, causado pela pentoxifilina, pode ter promovido efeitos diretos no controle flagelar do espermatozóide (SABERWAL et al., 2002).

De acordo com Suarez et al. (1991), altos índices de BCF poderiam facilitar a penetração na zona pelúcida. Considerando que os espermatozóides da cauda do epidídimo possuem baixos parâmetros de movimentação após a colheita, a incubação destas células espermáticas recém-recuperadas em pentoxifilina poderia exercer um efeito satisfatório sobre o processo de fertilização. No entanto, após 15 minutos de incubação 37°C, não foi observada diferença significativa nesta variável entre as amostras analisadas.

Adicionalmente, as amostras recém-recuperadas em diluidor com pentoxifilina demonstraram maior número de espermatozóides móveis em comparação às amostras recém-recuperadas em diluidor sem a presença desta substância. Isto se deve ao fato de que os espermatozóides da cauda do epidídimo se mantêm quiescentes em seu fluido nativo, entretanto após a diluição, seja em meio diluidor ou plasma seminal, estas células podem exercer capacidade total de motilidade (TURNER & HOWARD, 1978). Este fato discorda com os relatos de Tesarik et al. (1992), onde os autores relatam que a pentoxifilina não aumenta o número de espermatozóides móveis, apenas promove a melhora dos parâmetros espermáticos das células móveis. Provavelmente, este resultado se deve a origem das amostras avaliadas, no qual foram utilizados somente espermatozóides do ejaculado, onde em condições normais, a maioria das células espermáticas apresenta movimentação. No entanto, nossos resultados concordam com os achados de Ponce et al. (1999) onde foi observado um aumento no número de espermatozóides móveis após a adição de 5 mM pentoxifilina nas amostras recuperadas da cauda do epidídimo de camundongos.

Não houve diferença significativa na avaliação de integridade da membrana plasmática entre as amostras recém-recuperadas em diluidor sem ou com pentoxifilina. Tal resultado indica que a presença da pentoxifilina não afetou a viabilidade das células espermáticas e o diluidor contendo esta substância pode ser utilizado na metodologia do fluxo retrógrado, com intuito de melhorar a cinética espermática após a recuperação dos espermatozóides da cauda do epidídimo.

Segundo Martínez-Rodríguez (2005), algumas variáveis geradas pela técnica CASA, como a linearidade espermática, parecem apresentar uma maior correlação com a fertilidade. Os resultados do presente experimento demonstraram diferenças significativas entre as amostras sem ou com pentoxifilina somente nas variáveis MP e LIN, após a centrifugação e ressuspensão em meio diluidor de congelamento. Tais dados indicam que as amostras congeladas com pentoxifilina possuem maior capacidade de fertilização do que as amostras sem esta substância.

Em relação ao movimento espermático e a integridade de membrana plasmática após a descongelamento, não houve diferença significativa entre as amostras recuperadas em meio diluidor sem ou com pentoxifilina, como descrito na TABELA 4. Tais resultados corroboram com os achados de Stanic et al. (2002), onde a adição de pentoxifilina previamente ao processo de congelamento não promoveu melhoria nas amostras descongeladas.

No entanto, diferenças significativas nas variáveis espermáticas foram encontradas ao analisar individualmente cada diluidor, nos momentos antes e após a descongelação. Estes resultados podem ser justificados pelo esgotamento do substrato energético da célula espermática que ocorre durante o processo de criopreservação, independente da presença ou não da pentoxifilina, corroborando com relatos anteriores (GRADIL & BALL, 2000; STANIC et al., 2002; ESTEVES et al., 2007).

Discordando com estes resultados, Brennan e Holden (1995) verificaram que a adição de 1mM ou 3mM de pentoxifilina ao meio de congelação, promoveu um aumento significativo na motilidade espermática das amostras descongeladas de sêmen humano.

Deste modo, nossos resultados indicam que a adição de pentoxifilina previamente a congelação não promoveu resposta nos espermatozóides epididimários equinos após a descongelação, em termos de motilidade e viabilidade, devido aos danos causados à membrana espermática durante o processo de criopreservação ou pela concentração insuficiente de pentoxifilina utilizada no presente experimento. Além disso, de acordo com Wade et al. (2003), a pentoxifilina parece ter efeito imediato e transitório sobre os níveis de AMPc, o justifica a supressão dos efeitos desta substância nos diferentes momentos sobre os padrões de motilidade espermática.

Entretanto, estudos indicam que a adição de pentoxifilina após a descongelação do sêmen equino melhora a cinética espermática (GRADIL & BALL, 2000; MARQUES et al., 2002). O baixo estado metabólico dos espermatozóides após a descongelação acarreta a presença de uma grande proporção de células espermáticas imóveis com a membrana íntegra (MAKLER et al., 1980). Assim, a adição de pentoxifilina ao sêmen descongelado parece melhorar os padrões de movimento espermático destes espermatozóides pelo aumento dos níveis intracelulares de AMPc (GRADIL & BALL, 2000).

A pentoxifilina ao estimular a movimentação dos espermatozóides, pode também levar a capacitação espermática. Do mesmo modo, a criopreservação pode levar a reorganização da membrana plasmática e conseqüentemente promover a capacitação precoce, processo este denominado “criocapacitação” (BAILEY et al., 2000). No entanto, de acordo com a TABELA 5, não foi encontrada diferença significativa na avaliação da fosforilação da tirosina nas amostras recuperadas sem ou pentoxifilina após a descongelação, indicando que não ocorreu o processo de capacitação espermática.

Ainda, Visconti et al. (1995) indicam que a fosforilação da tirosina na presença de substâncias estimulantes, como a pentoxifilina, ocorre de modo dose-dependente, e na ausência destas substâncias, o processo é tempo-dependente. Nesse sentido, presume-se que a concentração de pentoxifilina e o tempo de incubação utilizado não foram suficientes para promover tal processo no presente experimento.

Os baixos valores de motilidade encontrados nas amostras recém-recuperadas se devem ao fato de que os espermatozóides na cauda do epidídimo, em sua maioria, se encontram imóvel, como demonstrado na TABELA 6 e 7. A manutenção da quiescência dos espermatozóides no epidídimo representa uma estratégia biológica fundamental para a prevenção do gasto energético e mecânico das células espermáticas, auxiliando, desta forma, o armazenamento dos espermatozóides na cauda epididimária (TURNER & REICH, 1985).

Após a incubação à 37°C por 15 minutos foi observado um aumento nos padrões do movimento espermático. Estes resultados indicam que os substratos energéticos e o pH do meio diluidor levaram a melhora da cinética dos espermatozóides. Além disso, a diluição promove a dispersão dos fatores inibidores da motilidade, presentes no fluido epididimário (TURNER & REICH, 1985).

Após a centrifugação e ressuspensão, as amostras demonstraram valores significativamente superiores em relação às amostras recém-recuperadas ou após a incubação. É possível que o processo de centrifugação, ao separar a fração espermática, possibilitou a remoção dos fatores inibidores da motilidade presentes no fluido epididimário. Do mesmo modo, a ressuspensão das amostras em meio de congelação a base de gema de ovo Botu-Crio[®], melhorou a cinética espermática dos espermatozóides, provavelmente, devido aos substratos energéticos contidos neste meio. Resultados similares foram reportados por Turner e Reich (1985) ao observarem que a adição de 5% de gema de ovo ao meio diluidor aumentou a motilidade de espermatozóides recém-recuperados da cauda do epidídimo de humanos.

Assim, podemos sugerir que a centrifugação e ressuspensão das amostras recuperadas da cauda do epidídimo equino possibilitaram a expressão total da motilidade dos espermatozóides epididimários, sendo semelhante aos valores do ejaculado.

6.2 – Experimento II

No Experimento II foi avaliada a influência do meio diluidor e da dose inseminante sobre os índices de fertilidade de espermatozóides criopreservados da cauda do epidídimo.

Em nosso trabalho os resultados finais de concepção com espermatozóides do epidídimo equino foram de 50%, independente do meio diluidor utilizado e da dose inseminante. Os dados gerados encontram-se próximos aos valores de fertilidade obtidos com sêmen congelado do ejaculado (MONTEIRO, 2010).

De acordo com a TABELA 11, foi observada tendência ($p=0,07$) entre os grupos 800 Controle e 100 PTX. Tais resultados podem ser justificados pelo reduzido número de éguas inseminadas impossibilitando a obtenção de diferenças significativas ($p<0,05$) entre os grupos. Com base nestes dados, é possível que o índice superior de fertilidade encontrado no grupo 800 Controle se deve ao maior número de espermatozóides acessórios por oócito, ao compensar até mesmo as perdas espermáticas ocorridas durante o processo de congelação e o próprio transporte espermático no interior do trato feminino quando comparado ao grupo 100 Controle.

Com a similaridade do índice de concepção evidenciada entre os grupos inseminantes 800 Controle e 100 PTX ($p=0,07$) podemos sugerir que apesar da pentoxifilina não exercer efeito sobre os padrões de motilidade espermática após a descongelação das amostras, os efeitos desta substância podem ser demonstrados sobre a capacidade fecundante dos espermatozóides. Possivelmente, as modificações originadas na membrana plasmática e no metabolismo dos espermatozóides por esta substância previamente a congelação contribuíram para o aumento da capacidade fecundante das células espermáticas, ao notar-se analogia entre os grupos 800 Controle e 100 PTX, compensando até mesmo o menor número de espermatozóides na dose inseminante.

Desta forma, o limitado número de doses recuperadas da cauda do epidídimo pode ter sua aplicação maximizada com a utilização de apenas 1 palheta com 100×10^6 de espermatozóides recuperados com meio diluidor contendo PTX ao invés da dose convencional de 8 palhetas (800×10^6 de espermatozóides), vindo a comprovar a metodologia inicialmente proposta no presente estudo. Tal fato se torna ainda mais relevante ao considerar que as doses estocadas da cauda do epidídimo são limitadas e não poderão ser repostas, e ainda garantem níveis aceitáveis de concepção.

No presente estudo, o índice de concepção ao utilizar reduzido número de espermatozóides epididimários foi maior do que os índices demonstrados por Morris et. al. (2002), sendo este o único relato a utilizar baixa dose inseminante de espermatozóides epididimários criopreservados em equinos. Em tal estudo, foram relatados índices de concepção de 18% com inseminações histeroscópicas e 8% com inseminações convencionais, na dose de 200×10^6 espermatozóides totais. Ao reduzir a dose inseminante para 10×10^6 espermatozóides móveis, obteve-se 29% de taxa de prenhez após a exposição dos espermatozóides ao meio Sperm talp.

As diferenças entre a metodologia de processamento dos epidídimos, o diluidor de congelação e o protocolo de inseminação artificial utilizado podem ter contribuído para obtenção dos diferentes resultados.

Resultados similares ao grupo 800 Controle foram encontrados por Papa et al. (2008) ao avaliarem a fertilidade de espermatozóides colhidos da cauda do epidídimo equino. Em tal estudo foi utilizado o mesmo protocolo de congelação do grupo 800 Controle do presente experimento, e obtiveram o índice de concepção de 66%.

No entanto, ao avaliarmos os índices de concepção em função da dose inseminante, independente do diluidor utilizado na recuperação dos espermatozóides da cauda do epidídimo não foram encontradas diferenças significativas. Como foram utilizados dois grupos inseminantes de 100×10^6 de espermatozóides (Controle e PTX), a junção de ambos os grupos pode ter exercido influência sobre os dados da TABELA 13, justificando a similaridade entre os grupos inseminados com 100×10^6 de espermatozóides ou com 800×10^6 de espermatozóides.

Ainda, ao analisar os índices de concepção em função do meio diluidor utilizado na recuperação dos espermatozóides da cauda do epidídimo, independente da dose inseminante aplicada também não foram encontradas diferenças significativas. Assim, podemos sugerir que os valores agregados de concepção do grupo 800 Controle e 100 Controle, elevaram as taxas de fertilidade do grupo Controle.

7.0 – CONCLUSÕES

7.1 – A pentoxifilina presente no meio diluidor utilizado no fluxo retrógrado exerce influência significativa sobre o padrão de movimento após a recuperação de espermatozóides da cauda do epidídimo.

7.2 – O processo de diluição, centrifugação e ressuspensão parecem eliminar os fatores inibidores da motilidade espermática presentes do fluido epididimário, e permitem a total expressão da motilidade dos espermatozóides da cauda do epidídimo, sendo semelhante aos valores de um ejaculado.

7.3 – Inseminações com reduzido número de espermatozóides na extremidade do corno uterino permitem a maximização do uso de espermatozóides epididimários congelados.

7.4 – O limitado número de doses recuperadas da cauda do epidídimo pode ter sua aplicação maximizada por meio de inseminações artificiais com apenas 100×10^6 de espermatozóides colhidos com meio diluidor contendo pentoxifilina, ao garantir aceitáveis índices de concepção.

8.0 – REFERÊNCIAS

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

ARRUDA, R.P. Importância da qualidade do sêmen em programas de IATF e TEFT. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 1., 2004, Londrina. **Anais...** Londrina, 2004, p.166-179.

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

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

BALL, B.A.; VO, A.T.; BAUMBER, J. Generation of reactive species by equine spermatozoa. **American Journal of Veterinary Research**, v.62, p.508-515, 2001.

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

BARTELS, P.; LUBBE, K.; KILIAN, I.; FRIEDMANN, Y.; VAN DYK, G.; MORTIMER, D. In vitro maturation and fertilization of lion (*Panthera leo*) oocytes using frozen thawed epididymal spermatozoa recovered by cauda epididymectomy of an immobilized lion. **Theriogenology**, v.53, p.325, 2000.

BAUMBER, J.; BALL, B.A.; LINFOR, J.J.; MEYERS, S.A. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. **Journal of Andrology**, v.24, p. 621-628, 2003.

BAZER, F.W.; GEISERT, R.D.; ZAVY, M.T. Fertilização, clivagem e implantação. In: HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**, 6 ed., São Paulo, 1995, p. 191-216.

BEDFORD, J.M.; HOSKINS, D.D. The mammalian spermatozoa. In: **Marshall's Physiology of Reproduction**. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1990. p.379.

BRENNAN, A.L.; HOLDEN, C.A. Pentoxifylline-supplemented cryoprotectant improves human sperm motility after cryopreservation. **Human Reproduction**, v.10, p.2308-2312, 1995.

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

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

BUCHANAN, B.R.; McCUE, P.M.; SQUIRES, E.L.; SEIDEL, G.E.; FLEURY, J.J. Pregnancy rates in mares following a single insemination with a low number of spermatozoa into the tip of the uterine horn. **Theriogenology**, v.51, p.395, 1999.

CALOGERO, A.E. Correlation between intracellular cAMP content, kinematic parameters and hyperactivation of human spermatozoa after incubation with pentoxifylline. **Human Reproduction**, v.13, p.911–915, 1998.

CARY, J.A.; MADILL, S.; FARNSWORTH, K.; HAYNA, J.T.; DUOOS, L.; FAHNING, M.L. A comparison of electroejaculation and epididymal sperm collection techniques in stallions. **The Canadian Veterinary Journal**, v.45, p.35-41, 2004.

CONSENTINO, M.J.; COCKETT, A.T.K. Review article: structure and function of the epididymis. **Urological Research**, v.14, p.229-240, 1986.

COOPER, T.G. The Epididymis, Sperm Maturation and Fertilization. In: **The male gamete: from basic science to clinical applications**, Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1986.

CLULOW, J.R.; BUSS, H.; SIEME, H.; RODGER, J.A.; CAWDELL-SMITH, A.J.; EVANS, G.; RATH, D.; MORRIS, L.H.; MAXWELL, W.M. Field fertility of sex-sorted and non-sorted frozen-thawed stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.108, p.287–297, 2008.

DACHEUX, J.L.; GATTI, J.L.; DACHEUX, F. Contribution of Epididymal Secretory Proteins for Spermatozoa Maturation. **Microscopy Research and Technique** v.61, p.7–17, 2003.

ESTEVEZ, S.C.; SPAINE, D.M.; CEDENHO, A.P. Effects of pentoxifylline treatment before freezing on motility, viability and acrosome status of poor quality human spermatozoa cryopreserved by the liquid nitrogen vapor nitrogen. **Brazilian Journal of Medicine and Biological Research**, v.40, p.985-992, 2007.

FERRARI, S. **Meios de capacitação espermática na espécie ovina (Ovis áries, Linnaeus, 1758): reação acrossômica e penetração in vitro em oócitos zona-free de hamster**. 1997. 71p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

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

FLESCH, F.M., GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1469, p.197–235, 2000.

GADELLA, B. M.; COLENBRANDER, B. Bicarbonate dependent capacitation of mammalian sperm cells: a comparative overview. In: PROCEEDINGS OF A WORKSHOP ON TRANSPORTING GAMETES AND EMBRYOS, 12, 2003, Massachusetts. **Proceedings...** 2003, p. 43-48.

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

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

GATTI, J.-L.; CASTELLA, S.; DAUCHEUX, F.; ECROYD, H.; MÉTAYER, S.; THIMON, V.; DACHEUX, J.-L. Post-testicular sperm environment and fertility. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p.321-339, 2004.

GIL, J.; JANUSKAUSKAS, A.; HAARD, M.; HAARD, M.G.; JOHANISSON, A.; SODERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Functional sperm parameters and fertility of bull semen extended in Biociphos-Plus and Triladyl. **Reproduction of Domestic Animals**, v.35, p.69-77, 2000.

GRADIL, C.M.; BALL, B.A. The effects of pentoxifylline to improve motility of cryopreserved equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.54, p.1041-1047, 2000.

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

GOULART, H.M.; SILVA, A.E.D.F.; McMANUS, C.; PAPA, F.O. Efeitos da pentoxifilina sobre a viabilidade *in vitro* dos espermatozóides de eqüinos, após o resfriamento a 5°C. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, p.112-122, 2004.

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

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

HARRISON, R. A. P.; VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 88, p.343-352, 1990.

HASSANPOUR, H.; MIRSHOKRAEI, P.; TAJIK, P.; HAGHPARAST, A. In vitro effects of pentoxifylline on kinematic parameters, capacitation, and acrossome reaction of ram epididymal sperm. **Comparative Clinical Pathology**, v.19, p.377-381, 2010.

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

HENKEL, R.; BITTNER, J.; WEBER, R.; HUTHER, F.; MISKA, W. Relevance of zinc in human sperm flagella and its relation to motility. **Fertility and Sterility**, v.71, p. 1138-1143, 1999.

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

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

HOSKINS, D.D.; BRANDT, H.; ACOTT, T.S. Initiation of sperm motility in the mammalian epididymis. **Federation Proceedings**, v.37, p.2534-2542, 1978.

HUNTER, R.H.F.; GREVE, T. Deep uterine insemination of cattle: a fruitful way forward with smaller numbers of spermatozoa. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.39, p.149–163,1998.

HUNTER, T. Tyrosine phosphorylation: past, present and future. **Biochemical Society Transactions**, v.24, p.307–327, 1996.

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

JOHNSON, A.E.M.; COUTINHO DA SILVA, M.A. Effects of recovery technique, freezing extender and antioxidants on motility parameters of cryopreserved stallion epididymal sperm. **Theriogenology**, v.70, p.579-580, 2008.

KANN, M.L.; SERRES, C. Development and initiation of sperm motility in the hamster epididymis. **Reproduction Nutrition Development**, v.20, p.1739-1749, 1980.

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

KARESKOSKI, M; KATILA, T. Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. **Animal Reproduction Science**, v. 107, p.249-256, 2008.

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

LYLE, S.K.; FERRER, M.S. Low-dose insemination-Why, when and how. **Theriogenology**, v.64, p.572-579, 2005.

LEÃO, K. M. **Avaliação de diferentes técnicas de inseminação artificial em éguas utilizando um baixo número de espermatozóides**. 2006. 149f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária de Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

MAKLER, A.; MAKLER, E.; ITZKOVITZ, J.; BRANDES, J. M. Factors affecting spermatozoa motility. IV. Incubation of human semen with caffeine, kallikrein, and other metabolic active compounds. **Fertility and Sterility**, v.33, p.624-630, 1980.

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

MARQUES, A.; ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; GOBESSO, A.A.O.; NEVES NETO, J.R. Effects of ascorbic acid and pentoxifylline on equine cryopreserved semen submitted to in vitro incubation. **Theriogenology**, v.58, p.257-260, 2002.

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

MARTÍNEZ-RODRIGUEZ, H. Methods for semen evaluation and their relationship to fertility. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16, 2005, Goiânia, **Anais...Goiânia**, 2005. p.1-8.

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

MARTINS, C.F.; DRIESSEN, K.; MELO COSTA, P.; CARVALHO-NETO, J.O.; DE SOUSA, R.V.; RUMPF, R.; DODE, M.N. Recovery, cryopreservation and fertilization

potential of bovine spermatozoa obtained from epididymides stored at 5 °C by different periods of time. **Animal Reproduction Science**. v.116, p.50-57, 2009.

MCDOWELL, K.J.; LITTLE, T.V.; TIMONEY, P.J.; ADAMS, M.H. Characterization of proteins in the seminal plasma of stallions, geldings and geldings supplemented with testosterone. **Journal of Veterinary Science**, v.61, p.33-37, 1996.

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

MONTEIRO, G.A. **Criopreservação e fertilidade de espermatozóides recuperados da cauda do epidídimo de garanhões**. Botucatu, 2010. 27-37p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

MONTEIRO, G. A.; GUAISTI, P.N.; PAPA, F.O.; FREITAS, N. N. P.; AVANZI, B.R.; ZAHN, F. S.; MELO, C. M.; DELLAQUA JR., J. A. Fertility of epididymal sperm from subfertile stallions In: SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 2010, Porto de Galinhas. **Acta Scientiae Veterinariae**, 2010. v.38. p.688.

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

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

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

MURADÁS, P.R.; WEISS, R.R.; KOZICKI, L.E.; GRANEMANN, L.C.; SANTOS, I.W.; PIMPÃO, C.T. Alguns parâmetros de viabilidade de espermatozóides equínos

colhidos por vagina artificial e por lavagem da cauda do epidídimo. **Archives of Veterinary Science**, v.11, p.69-74, 2006.

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

PAPA, F.O.; MONTEIRO, G. A.; GUASTI, P.N.; MELO, C. M.; DELLAQUA JR., J. A.; AVANZI, B.R.; DELLAQUA-FREITAS, C. P.; CRESPILOHO, A. M.; ZAHN, F. S.; MARTIN, I.; ALVARENGA, M.A. Advances in Stallion epididymal sperm technology In: LEIPZIGER TIERÄRZTKONGRESS, 2010, Leipzig. **Proceedings...**, 2010.

PARRISH, J.J., SUSKO-PARRISH, J.L., UGUZ, C., FIRST, N.L. Differences in the role of cyclic adenosine 39,59-monophosphate during capacitation of bovine sperm by heparin or oviduct fluid. **Biology of Reproduction**, v.51, p.1099– 1108, 1994.

PARKER, W.G.; SULLIVAN, J.J.; FIRST, N.L. Sperm transport and distribution in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.23, p.63-66, 1975.

PASQUINI, D.F.; MELO, C.M.; PAPA, F.O.; FIORATTI, E.G.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; ALVARENGA, M.A.; ZAHN, F.S.; DE VITA, B.; DELL'AQUA Jr, J.A. Effects of seminal plasma and sperm motility factors on viability of epididymal sperm of stallions. In: INTERNACIONAL SYMPOSIUM ON STALLION REPRODUCTION, 5, 2008, Gramado. **Abstract...** Animal Reproduction Science, 2008. p. 37.

POMMER, A.C.; RUTLLAND, J.; MEYERS, S.A. Phosphorylation of protein tyrosine residues in fresh and cryopreserved stallion spermatozoa under capacitating conditions. **Biology of Reproduction**, v.68, p.1208-1214, 2003.

PONCE, A.A.; CUNEO, M.F.; RUIZ, R.D.; VINCENTI, L.M.; SANTILLÁ, M.E.; STUTZ, G.; LACUARA, J.L. Influence of pentoxifylline on sperm membrane functional integrity. **Archives of Andrology**, v.43, p.77-84, 1999.

SABERWAL, G.S.; SHARMA, M.K.; BALASINOR, N.; CHOUDHARY, J; JUNEJA, H.S. Estrogen receptor, calcium mobilization and rat sperm motility. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.237, p.11–20, 2002.

SAMPER, J.C.; GOMEZ, I.; SANCHEZ, R. Rectally Guided or Hysteroscopic Insemination: is there a difference? **Journal of Equine Veterinary Science**, v.28, p.640–644, 2008.

SAMPER, J.C.; PLOUGH, T. Techniques for the insemination of low doses of stallion sperm. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, p.35-39, 2010.

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

SQUIRES, E.L.; TODTER, G.E.; BERNDTSON, W.E.; PICKETT, B.W. Effect of anabolic steroids on reproductive function of young stallions. **Journal of Animal Science**, v.54, p.576-582, 1982.

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

STANIC, P.; SONICKI, Z.; SUCHANEK, E. Effect of pentoxifylline and membrane integrity of cryopreserved human spermatozoa. **International Journal of Andrology**, v.25, p.186-190, 2002.

SUAREZ, S.S.; KATZ, D.F.; OWEN, D.H.; ANDREW, J.B.; POWELL, R.L. Evidence for the function of hyperactivated motility in sperm. **Biology of Reproduction**, v.44, p.375-381, 1991.

TESARIK, J.; THEBAULT, A.; TESTART, J. Effect of pentoxifylline on sperm movement characteristics in normozoospermic and asthenozoospermic specimens. **Human Reproduction**, v.7, p.1257–1263, 1992.

TURNER, T.T.; REICH, G.W. Cauda epididymidal sperm motility: A comparison among five species. **Biology of Reproduction**, v.32, p.120-128, 1985.

TURNER, T.T.; HOWARDS, S.S. Factors involved in the initiation of sperm motility. **Biology of Reproduction**, v.18, p.571-578, 1978.

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

USSELMAN, M.C; CONE, R.A. Rat sperm are mechanically immobilized in the caudal epididymis by “immobilin,” a high molecular weight glycoprotein. **Biology of Reproduction**, v.29, p.1241–1253, 1983.

VAZQUEZ, J.J.; MEDINA, V.; LIU, I.K.; BALL, B.A.; SCOTT, M.A. Nonsurgical uterotubal insemination in the mare. In: ANNUAL MEETING OF SOCIETY FOR THERIOGENOLOGY, 1998, Baltimore. **Proceedings...** Baltimore, 1998. p.82-3.

VISCONTI, P.E.; MOORE, G.D.; BAILEY, J.L.; LECLERC, P.; CONNORS, S.A.; PAN, D.; OLDS-CLARKE, P.; KOPF, G.S. Capacitation of mouse spermatozoa II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. **Development**, v.121, p.1139-1150, 1995.

VISCONTI, P.E.; WESTBROOK, V.A.; CHERTIHIN, O.; DEMARCO, I.; SLEIGHT, S.; DIEKMAN, A.B. Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. **Journal of Reproductive Immunology**, v.53, p.133-150, 2002.

WADE, M.A.; JONES, R.C.; MURDOCH, R.N.; AITKEN, R.J. Motility activation and second messenger signaling in spermatozoa from rat cauda epididymidis. **Reproduction**, v.125, p.175–183, 2003.

WEEMS, J.C.; BYERS, W. How to incorporate low-dose hysteroscopic insemination in a on-farm fresh semen program. In: CONVENTION OF THE AMERICAN

ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 50., 2004, Lexington. **Proceedings...** Lexington: 2004.

WITE, R.G. Secreções do trato reprodutivo masculino e plasma seminal. In: HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**, São Paulo: Manole, 1988, p.212-28.

XAVIER, I.L.G.S.; SILVA FILHO, J.M.; CARVALHO, G.R.; PALHARES, M.S.; ROSSI, R.; SIQUEIRA, A.P. Efeitos do local de deposição do sêmen e do intervalo inseminação/ovulação sobre a fertilidade de éguas inseminadas com sêmen fresco diluído. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, 2010.

YOVICH, J.L. Pentoxifylline: actions and applications in assisted reproduction. **Human Reproduction**, v.8, p.1786-1791, 1993.

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

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: KNOBIL, E.; NEILLS, J. (Eds), **The physiology of reproduction**. New York: Raven Press, 1994. p.189-317.

ZAHN, F.S. **Avaliação dos constituintes bioquímicos e protéicos do plasma seminal e do soro sanguíneo e das proteínas de membrana espermática e sua correlação com a qualidade do sêmen congelado em garanhões**. Botucatu, 2006. 25 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

9.0 - TRABALHO CIENTÍFICO

Advances in stallion's epididymal sperm technology

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

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

Summary

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

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

Fortschritte in der Technologie von Nebenhodensperma beim Hengst

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

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

Introduction

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

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

Epididymal removal and shipment

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

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

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

Collection of epididymal sperm

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

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

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

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

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

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

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

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

Preservation of epididymal sperm

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Influence of seminal plasma on fertility of epididymal sperm

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

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

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

Fertility of epididymal sperm

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

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

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

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

Conclusion

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

References

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

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

Advances in stallion's epididymal sperm technology

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

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

ANEXOS

ANEXO I

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

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

ANEXO II - PREPARO DAS SONDAS FLUORESCENTES

SOLUÇÃO DE ESTOQUE

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

1 - P 4170 - Sigma

2 - C 5041 – Sigma

SOLUÇÃO DE TRABALHO

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

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)