

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS GRADUAÇÃO E PESQUISA
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
ANTONIO CAVALCANTE MOTA FILHO

CONSERVAÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES RECUPERADOS DA
CAUDA DO EPIDÍDIMO DE CÃES

FORTALEZA, CEARÁ

Julho 2014

ANTONIO CAVALCANTE MOTA FILHO

CONSERVAÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES RECUPERADOS DA CAUDA
DO EPIDÍDIMO DE CÃES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal Linha de pesquisa: Reprodução e Sanidade de carnívoros, onívoros, herbívoros e aves. Orientador: Prof. Dra. Lucia Daniel Machado da Silva

FORTALEZA

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Estadual do Ceará

Sistema de Bibliotecas

Mota Filho, Antonio Cavalcante.

Conservação de espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo de cães [recurso eletrônico] / Antonio Cavalcante Mota Filho. - 2014.

1 CD-ROM: il.; 4 ¼ pol.

CD-ROM contendo o arquivo no formato PDF do trabalho acadêmico com 78 folhas, acondicionado em caixa de DVD Slim (19 x 14 cm x 7 mm).

Tese (doutorado) - Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Fortaleza, 2014.

Área de concentração: Reprodução de carnívoros, onívoros e aves.

Orientação: Prof.^a Dra. Dra. Lúcia Daniel Machado da Silva.

Coorientação: Prof. Dr. Dr. Alexandre Rodrigues Silva.

1. Epidídimo. 2. Espermatozoide. 3. Cão. I. Título.

ANTONIO CAVACANTE MOTA FILHO

CONSERVAÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES RECUPERADOS DA
CAUDA DO EPIDÍDIMO DE CÃES

Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação em
Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da
Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial
para a obtenção do título de Doutor em
Ciências Veterinárias.

Aprovada em: 11 / 07 / 2014

BANCA EXAMINADORA

Lúcia D.M. da Silva

Profª. Dra. Lúcia Daniel Machado da Silva

Universidade Estadual do Ceará

Orientadora

Alexandre Rodrigues Silva

Prof. Dr. Alexandre Rodrigues Silva

Universidade Federal Rural Semi-Árido

Co-Orientador

Carla Renata Figueiredo Gadelha

Profª. Dra. Carla Renata Figueiredo Gadelha

Universidade Federal do Ceará

Examinador

Airton Alencar de Araújo

Prof. Dr. Airton Alencar de Araújo

Universidade Estadual do Ceará

Examinador

Ticiana Franco Pereira de Silva

Profª. Dra. Ticiana Franco Pereira Silva

Universidade Estadual do Ceará

Examinador

Aos meus pais, Antônio e Lúcia,
pelas valorosas lições de vida e
pela eterna confiança em minhas
escolhas.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força, coragem, conformação, conforto, amor e sabedoria que me foram dadas para enfrentar os momentos mais difíceis, superar aprovações e continuar seguindo meu caminho rumo à conclusão desta etapa.

A Funcap e CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

A todos os funcionários do CCZ, por todo apoio e ajuda, mas principalmente a cada animal que contribuiu na minha pesquisa, aqueles que fixavam o olhar para mim e me pediam ajuda, meu respeito e muito obrigado.

A Universidade Estadual do Ceará e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, pela oportunidade de realização do curso, em especial aos todos os seus funcionários Adriana Albuquerque e Antônio Cesar Camelo, coordenadores, ex-coordenadores e professores, em especial ao Prof. Dácio Teixeira e Davide Rondina.

A *Mississippi State University* na pessoa do Dr. Jean M. Feugang e Dr. Peter Ryan.

Ao meu pai Antonio Cavalcante Mota e minha mãe Lúcia Maria Nascimento Vale Mota por todo amor, incentivo, dedicação e apoio ofertados a mim.

Aos minhas irmãs Giulianne e Gabriela e meu cunhado Alceu, pelo incentivo pela força, carinho, oração e compreensão oferecidos a mim em todos os momentos.

Aos meus sobrinhos Pedro e Davi, a quem os considero irmãos e que me alegam todos os dias.

Aos meus padrinhos Adolfo e Cleide que em muitas vezes substituem meus pais, meu muito obrigado por estarem ao meu lado apoiando a realização dos meus sonhos.

A minha noiva Benilia Nogueira, que me ajuda com conselhos, amor, carinho e me acompanha sempre, principalmente nas horas mais difíceis da minha vida.

Meus avos Geraldo (*In memorian*), Osório (*In memorian*), Raimunda (*In memorian*) e Cremilda por sempre rezarem por mim e acreditarem que o estudo seria importante na minha vida.

Aos meus tios, Antonio Alberto, Roberto, Geraldo, Germilda, KK, mas em especial ao meu amado amigo Marcelino (*In memorian*) que alegrava nossas manhãs com suas piadas e nos deixou um vazio imenso nos nossos corações.

Aos tios distantes que sempre me apoiam.

À Professora Lúcia Daniel Machado da Silva, não tenho palavras para agradecer sua paciência, orientação, amizade, conselhos e ensinamentos constantes. Sentirei muitas saudades das nossas reuniões, churrascos, aniversários e de ver seu sorriso estampado quando conversávamos. MUITO OBRIGADO!!!!

Ao orientador e AMIGO Alexandre Rodrigues Silva, feliz o dia em que conheci você, um dos responsáveis pela minha caminhada, sem suas críticas jamais estaria concluindo essa etapa na minha carreira.

Ao Jean M. Feugang e Peter Ryan por terem me recepcionado tão bem na Mississippi State University, pelos ensinamentos, paciência, amizade, e me dando todo suporte que precisei nos Estados Unidos.

Aos membros da banca por terem aceitado prontamente meu convite: Airton Alencar (por sempre me ajudar na condução da análise estatística e por ser um grande colaborador nessa tese), Rita Cardoso e Toniolli que por motivos justos não puderam estar presentes na banca, Renata Gadelha que gentilmente contribuiu para elaboração do projeto e Ticiania Franco por ajudar sempre.

A todos os amigos que deixei nos EUA e que me ajudaram no período em que estive lá, em especial: Dr. Jean, Dr. Peter, Cal, Christy, Rodrigo, Walter, Victor, Danilo, Kyle, Porti, Rebecca, Torre Bova, Michael, Cori e Darby. *“To all the friends I left the U.S. and that helped me during the period I was there, in particular: Dr. Jean, Dr. Peter, Dr. Cal, Christy, Rodrigo, Walter, Victor, Danilo, Kyle, Porti, Rebecca, Torre Bova, Michael, Cori and Darby.”*

Aos amigos do LRC que ajudaram na condução dos trabalhos dentre eles: Herlon, Luma, Thalles, Nicodemos Pinto, Cynthia, Luana, Mirley, Claudia, Gabriela, Carmem, mas em especial a nossa amada Henna, ela foi fundamental no suporte dos experimentos. Meu muito obrigado.

Às minhas amigos(as) pelo apoio, conselhos, ensinamentos, compreensão, ajuda e pelos momentos de descontração que fizeram os meus dias ficarem mais agradáveis.

Aos meus cães: Seth, Rauli, Bella, Vicky, Apple e Pitoco, que sempre modificam meu humor quando chego em casa.

Agradeço também a todos aqueles que de uma forma ou de outra me ajudaram.

RESUMO

O objetivo da presente tese foi avaliar a viabilidade dos espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo, usando dois diferentes diluidores. Foram utilizados animais oriundos do Centro de Controle de Zoonoses de Fortaleza. O trabalho foi dividido em dois experimentos. Experimento 1: avaliação da qualidade dos espermatozoides epididimários, após o complexo-testículo epidídimo (CTE) terem sido armazenados *in situ* a 4 °C por 6, 12 e 18 h. Experimento 2: avaliação da qualidade dos espermatozoides epididimários congelados após terem sido conservados *in situ* a 4 °C por 12h. No experimento 1: Foram utilizados 60 cães machos adultos, com peso de 10-20 kg. Para a refrigeração e recuperação dos espermatozoides epididimários, 60 pares do CTE foram divididos em 4 grupos, de acordo com o tempo de refrigeração do CTE e posterior recuperação espermática: G0h, G6h, G12h e G18h, em que cada par do CTE permaneceu por zero, seis, doze ou dezoito horas a 4°C. A recuperação dos espermatozoides da cauda do epidídimo foi realizada pela técnica de flutuação utilizando-se o diluidor ACP-106c ou Tris. Avaliou-se a morfologia, funcionalidade e motilidade espermática total e progressiva, além de parâmetros obtidos pelo CASA. Os dados foram submetidos à ANOVA seguido do teste de Tukey ($P < 0,05$). Em todos os parâmetros avaliados, não houve diferença entre os diluidores testados ($P > 0,05$). Os valores de motilidade total nos grupos G0h, G6h, G12h, e G18h para o ACP-106c foram $84,4 \pm 7,7$; $81,6 \pm 11,6$; $88,3 \pm 6,5$ e $69,5 \pm 16,9$, respectivamente, e para o Tris $85,2 \pm 8,7$; $77,4 \pm 14,3$; $79,0 \pm 17,8$ e $65,4 \pm 17,9$, respectivamente. No experimento 2: Foram utilizados 60 cães machos adultos, com peso de 10-20 kg. Removeu-se o complexo testículo-epidídimo (CTE) que foi imerso em solução fisiológica 0,9% e transportado em caixa térmica ao laboratório. Os 60 CTE foram divididos em 4 grupos de acordo com o tempo de refrigeração (0h ou 12h) a 4°C e de acordo com o diluidor (ACP-106c ou TRIS) empregado para a recuperação espermática, constituindo os 4 grupos experimentais: (G0h-ACP, G12h-ACP, G0h-TRIS e G12h-TRIS). A recuperação dos espermatozoides da cauda do epidídimo foi realizada pela técnica de fluxo retrogrado. Em seguida, o material obtido foi centrifugado a 800g/5 minutos para remoção dos resíduos celulares e submetidos à criopreservação. Para cada epidídimo foi adicionado 1,0 mL de um dos dois diluidores, pré-aquecidos a 37°C por 5 minutos, uma semana após foram descongelados a 37°C/1 min e submetidos à avaliação de morfologia, funcionalidade e motilidade espermática total e progressiva, além de parâmetros obtidos pelo CASA. Os dados foram submetidos à MANOVA ($P < 0,05$). Os valores de motilidade total nos grupos G0h e G12h, para o ACP-106c foram, $52,17 \pm 1,78$; $49,8 \pm 1,93$ e Tris $50,7 \pm 2,06$ e $43,90 \pm 2,51$,

respectivamente. Conclui-se que o ACP-106c pode ser utilizado para recuperar os espermatozoides epididimários refrigerados e podem ser viáveis por até 12h de refrigeração. O diluidor ACP-106c, pode ser utilizado para criopreservação de espermatozoides epididimários caninos, devendo realizar o procedimento de congelamento, imediatamente após recuperação espermática.

Palavras chave: Epidídimo. Espermatozoide. Cão

ABSTRACT

The aim of this thesis was to evaluate the viability of spermatozoa recovered from the cauda epididymis, using two different extenders. Animals from the Control Center Zoonoses Fortaleza were used. The work was divided into two experiments. Experiment 1: assessment of the quality of epididymal sperm after epididymal-testicular complex in situ were stored at 4 ° C for 6, 12 and 18 h. Experiment 2: evaluation of the quality of frozen epididymal sperm after being preserved in situ at 4 ° C for 12h. In experiment 1: 60 adult male dogs were used, weighing 10-20 kg. For cooling and recovery of epididymal spermatozoa, 60 pairs of CTE were divided into 4 groups according to the time of cooling CTE and subsequent sperm recovery: G0h, G6H, G12H and G18h, where each pair of CTE remained for zero, six, twelve or eighteen hours at 4 ° C. The recovery of sperm tail of the epididymis was performed by floating using the ACP-Tris extender or 106c. We evaluated the morphology, functionality and total and progressive motility, and parameters obtained by CASA. Data were analyzed by ANOVA followed by Tukey's test ($P < 0.05$). In all treatments, there was no difference between the tested extenders ($P > 0.05$). The values of total motility in groups G0h, G6H, G12H, and G18h for ACP-106c were 84.4 ± 7.7 ; 81.6 ± 11.6 ; 88.3 ± 6.5 and 69.5 ± 16.9 , respectively, and 85.2 ± 8.7 Tris; 77.4 ± 14.3 ; 79.0 ± 17.8 and 65.4 ± 17.9 , respectively. In experiment 2: 60 adult male dogs were used, weighing 10-20 kg. Removal of the testes, epididymis complex (CTE) which was immersed in 0.9% saline and transported to the laboratory in a thermal box. 60 CTE were divided into 4 groups according to a cooling time (0h and 12h) at 4 ° C and in accordance with thinner (ACP-106c or TRIS) used for sperm recovery, forming the 4 experimental groups: (G0h-ACP, ACP-G12H, G12H and G0h-TRIS-TRIS). The recovery of sperm from the cauda epididymis was performed using the technique of retrograde flow. Then, the material was centrifuged at 800g / 5 minutes to remove cell waste and subjected to cryopreservation. For each epididymis was added 1.0 ml of one of the two extenders, preheated to 37 ° C for 5 minutes, were thawed one week at 37 ° C / 1 min and examined for morphology, motility and full functionality and progressive, and parameters obtained by CASA. The data were subjected to MANOVA ($P < 0.05$). The values of total motility in groups G0h and G12H, for the ACP-106c were 52.17 ± 1.78 ; 49.8 ± 1.93 and 50.7 ± 2.06 Tris and 43.90 ± 2.51 , respectively. It is concluded that the ACP-106c can be used to recover the chilled epididymal spermatozoa and may be viable for up to 12 hours of cooling. The ACP-106c, thinner can be used for cryopreservation of canine epididymal sperm, and must perform the procedure for freezing sperm immediately after recovery.

Key words: Epididymis. Sperm. Dog

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1- Morfologia espermática (média $\pm$ DP) em relação aos períodos de avaliação utilizando (A) o diluidor ACP-106c e (B) Tris ($P>0,05$).....39

Figura 2- Percentual (média $\pm$ DP) de espermatozoides com cauda enrolada (funcionalidade espermática) em relação aos períodos de avaliação utilizando o diluidor ACP-106c e Tris ($P>0,05$).....39

Figura 3- Motilidade total (média $\pm$ DP) em relação aos períodos de avaliação utilizando o diluidor ACP-106c e Tris ($P>0,05$).....39

Capítulo 2

Figura 1- Group division scheme: G0h-ACP (sperm recovered from the epididymis immediately after orchiectomy, using ACP-106c as the extender), G0h-TRIS (sperm recovered from the epididymis immediately after orchiectomy, using TRIS as the extender), G12h-ACP (sperm recovered from the epididymis 12 h after cooling at 4 °C, using ACP-106c as the extender), G12h-TRIS (sperm recovered from the epididymis 12 h after cooling at 4 °C, using TRIS as the extender).....46

LISTA DE TABELAS

Revisao bibliográfica

Tabela 1- Métodos de recuperação de espermatozoides epididimários nos mamíferos.....	26
---	----

Capítulo 1

Tabela 1- Percentual (média $\pm$ DP) de motilidade progressiva por meio da análise computadorizada, utilizando os diluidores ACP-106c e Tris para a recuperação de espermatozoides epididimários após serem mantidos refrigerados por 0, 6, 12 ou 18h.....	39
--	----

Tabela 2- VAP, VCL, VSL, LIN E STR (média $\pm$ desvio padrão), utilizando os diluidores ACP-106c e Tris para a recuperação de espermatozoides epididimários após serem mantidos refrigerados por 0, 6, 12.....	40
--	----

Capítulo 2

Tabela 1- The parameters of epididymal sperm (mean $\pm$ standard deviation) assessed by computer-assisted analysis as well as sperm morphology and hyposmotic tests. The sperm were cryopreserved using either ACP-106c or TRIS as the extender at two different cryopreservation times: immediately after sperm recovery (G0h) or after 12 h of storage(G12h).....	47
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	: Porcentagem
$\mu\text{m/s}$	: Micrômetros por Segundo
<	: Menor
>	: Maior
$\pm$	: Mais ou menos
$\leq$	: Menor ou igual
$\geq$	: Maior ou igual
$^{\circ}\text{C}$	: Graus Celsius
μm	: Micrômetros
ACP-106c	: Diluente à base de água de coco em pó formulado para a congelação de sêmen da espécie canina
ACP-106 [®]	: Diluente à base de água de coco em pó formulado para a conservação de sêmen da espécie canina
ACP [®]	: Água de coco em pó
ALH	: <i>Amplitude lateral head</i> (amplitude lateral da cabeça)
ANOVA	: Análise de variância
BCF	: <i>Beat cross frequency</i> (frequência de batimento cruzado)
CASA	: <i>Computer Assisted Semen Analysis</i> (análise de sêmen auxiliada por computador)
CBRA	: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
CNPq	: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico
CO ₂	: Dioxido de carbono
CTE	: Complexo testículo epididimo
DP	: Desvio padrão
FAVET	: Faculdade de Veterinária
FITC	: Isocianato de Fluoresceína
FIV	: Fertilização in vitro
FUNCAP	: Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico
HOST	: Hiposmótico

ICSI	: Injeção Intracitoplasmática do espermatozoide
IV	: Intravenosa
kDa	: Kilo Dalton
Kg	: Kilo grama
L	: Litro
LIN	: <i>Linearity</i> (linearidade)
LRC	: Laboratório de Reprodução de Carnívoros
mEq	: Miliequivalente
mL	: Mililitros
μL	: Microlitros
MP	: Motilidade progressiva
MT	: Motilidade total
MORFO	: Morfologia
MANOVA	: Análise multivariável de variância
SCA	: <i>Sperm Class Analyser</i>
SEM	: Erro padrão das médias
sptz	: Espermatozóide
sptz/mL	: Espermatozoides por mililitro
STR	: <i>Straightness</i> (retilinearidade)
pH	: Potencial de hidrogênio
TRIS	: Tris-hidroximetil-aminometano
TEC	: Testis epididymis complex
UECE	: Universidade Estadual do Ceará
VAP	: <i>Velocity average pathway</i> (velocidade média da trajetória)
VCL	: <i>Velocity curvilinear</i> (velocidade curvilínea)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 Espermatozoides epididimários.....	19
2.2 Maturação espermatozoides epididimários.....	20
2.3 Meios diluentes.....	31
2.4 Avaliação espermática.....	33
a) Motilidade espermática.....	33
b) Avaliação da morfologia espermática.....	34
c) Avaliação da função da membrana espermática.....	34
d) Análise computadorizada (CASA).....	35
3. JUSTIFICATIVA.....	37
4. HIPÓTESES CIENTÍFICAS.....	38
5. OBJETIVO GERAL.....	39
5.1 Objetivo geral.....	39
5.2 Objetivos Específicos.....	39
6. CAPÍTULO 1.....	40
7. CAPÍTULO 2.....	51
8. CONCLUSÕES.....	69
9. PERSPECTIVAS.....	70
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
 11. APENDICE.....	 84
12. ANEXOS.....	89

1. INTRODUÇÃO

Os animais domésticos, especialmente os cães, tornaram-se um elemento importante na sociedade humana. As mudanças na interação homem e animal conduziram a um interesse no mercado de reprodução de cães. Técnicas reprodutivas como inseminação artificial e coleta de sêmen e congelação são frequentemente usadas em cães, promovendo assim pesquisas *in vitro* que mimetizam os estudos *in vivo* (Ferreira, 2006).

Dentre essas biotécnicas, podem-se mencionar a recuperação e criopreservação de espermatozoides da cauda do epidídimo, sendo esta uma ferramenta importante na reprodução canina (Hewitt et al., 2001). É um recurso precioso em casos de animais de companhia de alto valor genético ou de grande estima, que precisam ser castrados ou que vêm a óbito, bem como espécies ameaçadas de extinção (Wildt et al, 1992). Já que os espermatozoides obtidos por esta técnica são morfolologicamente viáveis e retêm a capacidade de sofrer a reação de capacitação, ligar-se à zona pelúcida e fertilização (Goodrowe e Hay, 1993; Tsutsui *etal.*, 2003).

Diversos estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de armazenar os testículos e os epidídimos (Bruemmer *et al.*, 2002; James *et al.*, 2002; Martins *et al.*, 2009; Heise *et al.*, 2010; Contri *et al.*, 2011; Tamayo-Canulet *al.*, 2011; Lone *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2011). Tais estudos têm o objetivo de adequar um protocolo que possibilite a retirada do complexo testículo-epidídimo e seu posterior acondicionamento em sistemas de transporte para seu envio a laboratórios especializados para processamento e criopreservação dos espermatozoides.

Para a manutenção dessas espécies geneticamente estáveis, para a redução do estresse e custos causados pelo transporte de animais para acasalamento entre zoológicos ou reservas, a biotecnologia da reprodução se insere como uma ferramenta importante seja na inseminação artificial, transferência de embrião, ou mesmo na formação de um banco de material genético por meio da criopreservação de germoplasma (Wildt *et al*, 1992).

Para uma melhor compreensão do presente trabalho será abordado, a seguir, na revisão de literatura aspectos relacionados espermatozoides epididimários, maturação espermatozoides epididimários, colheita de espermatozoide do epidídimo, transporte do complexo testículo epididimo, qualidade dos espermatozoides colhidos da cauda do epididimo e congelação dos espermatozoides epididimários, meios diluidores e avaliação espermatozoides do epididimo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMÁRIOS

O epidídimo consiste de um longo ducto, altamente contorcido, que conecta os ductos eferentes ao ducto deferente. Dependendo da espécie, o comprimento do ducto epididimário pode variar de 3-4 metros, na espécie humana, até 80 metros como nos equinos. Morfologicamente, o epidídimo é geralmente dividido em três regiões: cabeça, corpo e cauda (Oliva et al., 2009).

Em um mamífero adulto, consiste em um ducto longo e enovelado revestido por epitélio pseudoestratificado, como observado para o coelho (Nicander, 1957), carneiro, touro e cavalo (Nicander, 1958), rato (Hamilton, 1975), cão (Orsi, 1983), hamster (Vicente & Orsi, 1987), gato (Viotto et al., 1988) e cuíca (Martinelli & Nogueira, 1992).

Nos mamíferos, o epidídimo possui diversas funções, ressaltando-se a reabsorção dos fluidos oriundos dos túbulos seminíferos, promovendo a concentração e o transporte espermáticos, a eliminação dos espermatozoides defeituosos, bem como a maturação e o armazenamento dos normais. A função de armazenamento é ilustrada pelo fato dos espermatozoides ejaculados sobreviverem por cerca de 24 horas fora do epidídimo em meio diluidor; enquanto que os que são mantidos na cauda do epidídimo (*in vivo*) permanecem com boa viabilidade por mais de 15 dias (Muradás et al., 2006).

Esta viabilidade é baseada na manutenção do metabolismo com baixa atividade, prevenindo a ativação prematura dos espermatozoides. Durante o armazenamento, o epidídimo acumula espermatozoides que podem ou não ser utilizados na cópula. O volume da cauda do epidídimo reflete a capacidade de armazenamento de espermatozoides do macho. Em touros e garanhões, o número de espermatozoides armazenados na cauda do epidídimo pode ser suficiente para até 10 ejaculações sucessivas, dependendo da idade, tamanho e atividade reprodutiva do animal (Bedford, 1994).

2.2 MATURAÇÃO ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMÁRIOS

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

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

Nos mamíferos, o epidídimo possui múltiplas funções: reabsorção dos fluídos dos túbulos seminíferos, promovendo a concentração do sêmen, transporte dos espermatozóides, eliminação dos espermatozóides defeituosos, maturação e armazenamento dos espermatozóides, que é bem ilustrado pelo fato de que os espermatozóides ejaculados sobrevivem por 24 horas ou mais fora do epidídimo, e são mantidos vivos por mais de 15 dias na cauda do epidídimo. Esta funcionalidade é baseada na manutenção do metabolismo com baixa atividade, prevenindo a ativação prematura dos espermatozóides; durante o período de armazenamento o epidídimo acumula espermatozóides suficientes para a cópula. O volume da cauda do epidídimo reflete a capacidade de armazenamento de espermatozóides do macho. Em touros e garanhões o número de espermatozóides armazenados na cauda do epidídimo pode ser suficiente para até 10 ejaculados sucessivos dependendo da idade, tamanho e atividade reprodutiva do animal (BEDFORD, 1994).

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

A síntese de proteínas e secreções epididimais no lúmen é regulada por andrógenos testiculares, que variam de um segmento para outro do epidídimo. Isto resulta numa mistura complexa de proteínas epididimais interagindo com o espermatozóide no lúmen do epidídimo.

O processo de maturação dos espermatozóides depende de uma seqüência de modificações espermáticas resultantes da interação da superfície do espermatozóide com diferentes fluídos intraluminais (RODRIGUEZ et al., 2001). O período de tempo para uma espermatogônia ser convertida em um espermatozóide incorporado dentro do lúmen do túbulo seminífero é de 55-57 dias no garanhão. Esse processo de liberação das espermátides no lúmen do túbulo seminífero é chamado de espermição. Aproximadamente 9 dias são necessários para o transporte dos espermatozóides através do sistema de ductos, conseqüentemente, uma população nova de espermatozóides pode ser ejaculada após 64-66 dias. Um ejaculado é, conseqüentemente, um composto dos eventos que ocorreram nos dois meses anteriores que influenciaram a espermatogênese quando os espermatozóides estavam sendo formados, e subseqüentemente o seu transporte e maturação através do sistema de ductos (AMANN, 1993; LOVE, 2002).

2.3 MEIOS DILUENTES

A composição do meio diluente é de vital importância para congelação do espermatozoide e deve ser ajustada para cada espécie. FOOTE (1964) e FOOTE & LEONARD (1964) foram os primeiros pesquisadores a investigar sistematicamente a combinação e a quantidade de vários componentes dos diluidores para a preservação do sêmen de cão.

Diferentes meios diluentes têm sido testados e utilizados, para os espermatozoides epididimários como os à base, tampão tris, diluidor à base de água de coco e diluidor à base de água de coco na forma de pó (CARDOSO, 2005). Além destes, muitas empresas desenvolvem seus próprios diluidores como o Triladyl, Laichipos 478, Biociphos W482 e o CLONE (OLIVEIRA, 2003).

O meio diluidor de sêmen deve conter propriedades que impeçam as mudanças nocivas de pH; conter nutrientes como fontes de energia; prevenir o crescimento de bactérias; manter pressão osmótica fisiológica e concentração de eletrólitos adequada; crioprotetores para reduzir os danos da congelação (CONCANNON e BATTISTA, 1989)

Para a composição do diluente a adição de gema de ovo, protege a membrana plasmática da célula espermática, restaurando os fosfolípidios perdidos durante o choque térmico oriundo da mudança de temperatura que ocorre durante o resfriamento inicial do sêmen (WATSON; PLUMMER, 1985; HAMMERSTEDT *et al.*, 1990).

Acredita-se que essa proteção possa ser devido à presença de uma lipoproteína chamada fosfatidilcolina. Durante o choque térmico, as lipoproteínas interagem com a estrutura lipídica da membrana plasmática das células espermáticas e propiciam a proteção. (BOUCHARD *et al.*, 1990). Para o sêmen do cão, a maioria dos autores utiliza concentrações de gema em torno de 20% no diluente (FARSTAD; ANDERSEN, 1975; LINDEFORSBERG; FORSBERG, 1989; SILVA, 2001; MARTINS, 2005).

Tem-se utilizado principalmente o diluente Tris para a congelação de sêmen canino, pois o mesmo mostra-se superior a outros diluentes (FARSTAD, 1996; SILVA *et al.*, 2000). O Tris (Tris-hidroximetil-aminometano - $\text{H}_2\text{NC}(\text{CH}_2\text{OH})_3$) não apenas apresenta atividade tamponante, como também atua na redução do metabolismo da frutose pela célula espermática, contribuindo assim para a preservação de sua energia (RODRIGUES, 1997).

Entretanto diversos estudos têm sido conduzidos com a água de coco (NUNES *et al.*, 2005). Tendo um grande interesse em seu uso como meio diluidor, sendo utilizado para a diluição do sêmen de diversas espécies como equinos (SAMPAIO-NETO *et al.*, 2002), diluição para inseminação artificial em caprinos (SALGUEIRO *et al.*, 2002), e em cães para resfriamento (MADEIRA *et al.*, 2004), inseminação artificial com sêmen a fresco e refrigerado (UCHOA *et al.*, 2004; UCHOA *et al.*, 2007) e congelação do sêmen UCHOA *et al.*, 2012). Devido à impossibilidade de armazenamento da água de coco e ainda objetivando a padronização e comercialização do referido diluidor, mesmo naquelas regiões onde o fruto não existe, foi desenvolvida a água de coco na forma de pó (ACP®).

2.2 AVALIAÇÃO ESPERMATOZOIDES DO EPIDÍDIMO CANINOS

Imediatamente após a obtenção do espermatozoide, este deve ser avaliado, com base em parâmetros microscópicos como motilidade, concentração, morfologia, e funcionalidade de membrana. A avaliação morfológica é essencial para se determinar a qualidade do espermatozoide (ZAMBELLI; CUNTO, 2006). Entretanto, a avaliação desses parâmetros não comprova a fertilidade animal. Desse modo, é sugestiva a realização de diversas avaliações conjuntamente, dentre as quais podem ser destacadas:

a) Motilidade espermática

A avaliação da motilidade espermática considera a porcentagem de espermatozóides móveis e sua intensidade de movimento (DERIVAUX, 1980). Segundo Seager e Fletcher (1972), a avaliação da motilidade espermática deve ser feita imediatamente após a colheita ou descongelação do espermatozoide, com o auxílio da microscopia óptica. Em seguida, deve-se avaliar o vigor espermático, por meio da intensidade do movimento dos espermatozóides, classificando numa escala de 0 a 5 (PLATZ; SEAGER, 1977; CHRISTHIANSEN, 1988).

A avaliação desses parâmetros por meio da microscopia óptica oferece limitações primárias como a subjetividade e a variabilidade (RIJSSELAERE et al., 2005). A determinação subjetiva da motilidade espermática pode ser influenciada pela temperatura de avaliação e pela qualificação do avaliador, levando a uma alta variabilidade entre os laboratórios (IGUER-OUADA; VERSTEGEN, 2001). A análise computadorizada (CASA) foi proposta pra suplantar o obstáculo de subjetividade nas análises de sêmen e vem sendo utilizada em diversas espécies animais, incluindo a canina (SILVA, 2005).

Apesar da avaliação da motilidade espermática não poder ser usada como uma mensuração dos espermatozóides vivos e mortos na amostra, ela fornece a informação de um fator que é necessário para a capacidade fertilizante do espermatozoide, pois a motilidade é a manifestação da sua competência estrutural e funcional (PEÑA MARTINEZ, 2004).

b) Avaliação da morfologia espermática

Várias classificações foram descritas para a morfologia espermática. SILVA.(2005) sugere a classificação das alterações morfológicas espermáticas em: primária, quando relacionadas a problema oriundo na gametogênese e secundária, quando diz respeito a maturação espermática no epidídimo, ou em consequência da manipulação do sêmen, como diluição, resfriamento, congelamento ou descongelamento. Segundo Cardoso et al. (2005), alterações secundárias têm pouca interferência sobre a fertilidade, quando comparadas às primárias. Porém, é importante enfatizar que a microscopia de luz não permite a visualização de danos na ultra-estrutura espermática, sendo aconselhável o emprego de outras técnicas como a microscopia eletrônica (SILVA et al., 2006).

Para realização da avaliação morfológica, destaca-se o uso do corante Rosa de Bengala (RODRIGUES, 1997) que permite não apenas a visualização da morfologia espermática, mas

também a avaliação da integridade do acrossoma e o corante Azul de Bromofenol (LIMA et al., 2007) que permite a contagem de espermatozóides vivos e mortos.

c) Avaliação da função da membrana espermática

O teste hiposmótico avalia a integridade funcional da célula espermática (SPITTALER; TYLER, 1985), sendo essa importante para o metabolismo celular. A resposta osmótica do sêmen fresco estaria correlacionada com a fertilidade em bovinos (REVELL; MRODE, 1994), javali (PEREZ-LLANO et al., 2001). Nos cães, a correlação da resposta osmótica com a fertilidade *in vivo* ou *in vitro* ainda não foi estabelecida (PEÑA-MARTINEZ, 2004).

d) Análise computadorizada (CASA)

Nas últimas décadas, diversos sistemas de análise computadorizada (CASA) do movimento espermático têm sido propostos e aplicados na tentativa de aumentar a acurácia da avaliação convencional do sêmen, além de incrementar o estudo da andrologia (TARDIF et al., 1997; VERSTEGEN et al., 2002; AMANN & KATZ, 2004; UCHOA et al., 2012).

CASA refere-se a um sistema automatizado (“hardware e software”) que visualiza e digitaliza imagens sucessivas dos espermatozóides móveis. Estes são posteriormente identificados em imagens que são analisadas e, desta forma, obtêm-se o estabelecimento de sua trajetória, fornecendo informações precisas e significativas da cinética das células (FARREL et al., 1998). Os resultados desses processamentos são refletidos em uma série de parâmetros que definem precisamente o exato movimento de cada espermatozóide (QUINTERO-MORENO et al., 2003).

A avaliação automatizada da motilidade dos espermatozoides é de grande interesse devido ao fato da cinética espermática ter relevância na determinação do potencial de fertilidade dos espermatozóides (FARREL et al., 1998; ARRUDA et al., 2007).

Apesar do seu alto custo, o sistema CASA oferece automatismo, rapidez e objetividade nas avaliações, possibilitando detalhar melhor a qualidade do sêmen analisado, fornecendo assim, informações e detalhes adicionais sobre as características de movimentação dos espermatozóides (FARREL et al., 1998; SOUSA, 2007).

De modo geral, os parâmetros da cinética espermática avaliados pelo sistema CASA (ARRUDA, 2000; SOUSA, 2007) são:

- Motilidade total (MT) - É a razão das células móveis no total de espermatozóides da amostra (%).
- Motilidade progressiva (MP) - É a razão das células móveis com movimento progressivo no total de espermatozóides da amostra (%).
- Velocidade média na trajetória (VAP)- É a indicação da trajetória geral do espermatozóide, sendo a velocidade média ininterrupta do caminho da célula ($\mu\text{m/s}$).
- Velocidade linear (VSL) - Considera a trajetória espermática como uma reta. É a velocidade média percorrida em linha reta entre o início e o final do percurso ($\mu\text{m/s}$).
- Velocidade curvilinear (VCL) - É a velocidade do deslocamento real dos espermatozóides, ou seja, é a velocidade média de cada ponto atual do trajeto seguido por cada célula ($\mu\text{m/s}$).
- Amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH)- Corresponde à largura média da oscilação da cabeça do espermatozóide durante seu deslocamento (μm).
- Frequência de batimento da cauda (BCF) – Visa fornecer indicações da frequência do batimento. É definida como a frequência com que a cabeça do espermatozóide move-se para trás e para frente durante um trajeto percorrido (Hz).
- Retilinearidade (STR) - É a medida do afastamento da trajetória da célula espermática considerando-se uma linha reta (uma comparação da linha reta com a média dos caminhos) (%).
- Linearidade (LIN) - É a medida do afastamento da célula espermática considerando-se a trajetória em uma linha reta (comparação da linha reta e os caminhos curvilíneos) (%).

De acordo com ARRUDA (2000), para os parâmetros motilidade progressiva, VAP, VSL, VCL, BCF, STR, LIN e RAPID, quanto maior for o valor numérico obtido, melhor deverá ser a qualidade espermática, e, opostamente, para o parâmetro ALH, quanto maior valor numérico obtido, pior a qualidade espermática..

3. JUSTIFICATIVA

A utilização de biotecnologias como a congelação de espermatozoide tem sido de grande importância na disseminação e preservação do potencial genético de diferentes espécies. Esta técnica possibilita uma distribuição do material genético dos reprodutores, além de viabilizar o armazenamento dos espermatozoides de animais em extinção.

Deste modo, a congelação de amostras de epidídimo tem sido realizada em diferentes espécies: cães (Martins et. al., 2006; Hewitt et al., 2001), gatos (Tebet et. al., 2006; Axnér et. al., 2004) com o objetivo de desenvolver técnicas adequadas ao armazenamento de gamoplasma de animais silvestres.

A congelação do espermatozoide do epidídimo pode ser a última oportunidade de se armazenar material de animais geneticamente superiores ou mesmo em extinção. Deste modo, a utilização de uma técnica adequada desde a colheita de epidídimos imediatamente após a morte ou castração, bem como o transporte dos epidídimos é de extrema importância para a qualidade das amostras a serem congeladas. A congelação de amostras do epidídimos em associação com outras biotécnicas é uma maneira de se obter mais produtos de um reprodutor após a sua morte.

A maioria dos trabalhos com recuperação de espermatozoides epididimários utilizam meios diluidores como: TRIS-ácido cítrico, TRIS-FRUTOSE-CITRATO (Ponglowhapan et al., 2006), solução fisiológica 0,9% (Martins et al., 2006; YU e LEIBO 2002), TRIS-GEMA e líquido prostático (Melo et al., 2010) e obtiveram resultados satisfatórios. Contudo podemos observar que não existem trabalhos que utilizam o diluidor a base água de coco, para a recuperação de espermatozoides epididimário em cães, podendo este diluidor alternativo ser superior aos já descritos na literatura.

Deste modo, em situações onde o momento e o local da castração ou morte do animal não são adequados a manipulação e preservação adequadas das amostras do epidídimo, ou ainda o técnico não apresente o domínio da técnica, os epidídimos deverão ser enviados a centros especializados para que o gamoplasma não seja alterado e perdido, fazendo-se necessário desenvolvimento de protocolos de transporte e recuperação que garantam boa qualidade espermática.

4. HIPÓTESES CIENTÍFICAS

- A recuperação dos espermatzoides do epididimo pode ser realizada até 18 horas de armazenamento a 4 °C.
- A congelação de espermatozoides epididimários é viável após 12 horas de armazenamento do complexo testículo epididimo 4 °C.
- A congelação de espermatozoides oriundos do epididimo com o diluidor ACP-106c podera apresentar melhores resultados em relação diluidor TRIS.

5. OBJETIVO

5.1 Geral

- Avaliar a conservação dos espermatozóides recuperados da cauda do epidídimo após a refrigeração usando dois diferentes diluidores.

5.2 Objetivos específicos

- Avaliar a qualidade dos espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo e armazenados após a refrigeração usando o diluidor ACP-106c.
- Avaliar a qualidade pós descongelação de espermatozoides caninos recuperados da cauda do epidídimo imediatamente após orquiectomia ou após 12 h de armazenamento a 4 ° C de CTE usando o diluidor ACP-106c.

RECUPERAÇÃO E CONSERVAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMÁRIOS DE MAMÍFEROS

[Recovery and conservation of epididymal sperm from mammals]

Antônio Cavalcante Mota Filho^{1,*}, Lúcia Daniel Machado da Silva²

¹ Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, CE.

² Professora Doutora da Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, CE.

RESUMO - Ao longo dos anos, foram desenvolvidas técnicas de colheita de sêmen em animais domésticos, como a massagem das ampolas dos ductos deferentes e massagem peniana, uso de vagina artificial e colheita direta da cavidade vaginal ou uterina. Contudo poucos estudos referentes à colheita de espermatozoides epididimários em animais domésticos até agora foram descritos. A recuperação de espermatozoides viáveis do epidídimo consiste em uma técnica importante para a obtenção de reservas de gametas de animais geneticamente valiosos ou de machos de espécies ameaçadas de extinção, constituindo-se em uma biotecnologia promissora para a reprodução dessas espécies. Uma vez recuperados os espermatozoides epididimários, faz-se necessário observar sua viabilidade, para posterior conservação. Assim, a presente revisão abordará esses pontos-chaves relacionados com os espermatozoides epididimários de diferentes espécies de mamíferos.

Palavras-Chave: Espermatozoide, epidídimo, animal.

ABSTRACT - Along the years, the techniques of semen collection of the domestic animals were developed, such as: the massage of vesicular glands and ampullae by way of rectum, penis massage, artificial vagina and the directly collection from the vaginal or uterine cavity. However few works concerning the epididymal sperm collection of domestic animals were described. The recovery of viable sperm from the epididymis is an important technique to obtain genetic conservation of valuable animals or threatened species, constituting in an important biotechnology for the reproduction of those species. Once recovered, it is necessary to observe the viability, for its subsequent conservation. Thus, the present review will approach those key-points related to the epididymal sperms from different species of mammals.

Keywords: Spermatozoa, epididymis, animal.

* Autor para correspondência. E-mail: acmfmedvet@hotmail.com.

INTRODUÇÃO

Técnicas extremamente interessantes para a conservação da biodiversidade estão sendo desenvolvidas, destacando-se a recuperação de espermatozoides do epidídimo de animais mortos; esses gametas, assim recolhidos são capazes de resistir após diferentes períodos, quando resfriados, até serem, posteriormente, criopreservados (Martins et al., 2007).

A obtenção de espermatozoides diretamente da cauda do epidídimo e ducto deferente consiste em uma técnica para os propósitos de reprodução assistida. Em geral, é um recurso importante em casos de animais de alto valor genético ou de grande estima, que precisam ser esterilizados ou que vêm a óbito. Tais espermatozoides obtidos por esta técnica são morfológicamente viáveis e mantêm a capacidade de sofrer capacitação, ligar-se à zona pelúcida e fecundar o oócito (Goodrowe & Hay, 1993; Tsutsui et al., 2003).

Diversos estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de armazenar os testículos e os epidídimos, objetivando-se resgatar os gametas (Bruemmer et al., 2002; James et al., 2002; Yu & Leibo, 2002; Martins et al., 2009; Heise et al., 2010; Lone et al., 2011; Tamayo-Canul et al., 2011; Contri et al., 2012). Tais estudos têm o intuito de adequar um protocolo que possibilite a retirada do complexo testículo-epidídimo e seu posterior acondicionamento em sistemas de transporte para seu envio a laboratórios especializados para processamento e criopreservação dos espermatozoides.

Após a morte do animal, os espermatozoides permanecem viáveis no epidídimo até que a degeneração tecidual *post mortem* afete sua viabilidade (Bruemmer et al., 2002; Muradás et al., 2006). Se os epidídimos forem armazenados a baixas temperaturas, a viabilidade espermática pode ser mantida por mais tempo (Bruemmer et al., 2002; James et al., 2002).

A criopreservação de espermatozoides do epidídimo tem sido usada em diferentes espécies: bodes (Santiago-Moreno et al., 2006), cães (Hewitt et al., 2001; Martins et al., 2006), cervídeos (Hishimuna et al., 2003; Soler et al., 2003; Martinez-Pastor et al., 2005a; 2006; Fernández-Santos et al., 2009), cutias (Silva et al., 2011), garanhões (Bruemmer et al., 2002; Neild et al., 2006), gatos (Tebet et al., 2006; Titarelli et al., 2006; Axné et al., 2004), gazelas (Saragusty et al., 2006; Chatiza et al., 2011), homens (Oates et al., 1996), javalis (Kikuchi et al., 1998), esquilos (Ping et al., 2011), camundongos

(Kishikawa et al., 1999; Sankai et al., 2001), touros (Martins et al., 2007) e varrões (Kolbe & Holtz, 1999).

Em vista da importância em se recuperar e armazenar os espermatozoides epididimários de diferentes espécies de mamíferos, a presente revisão visa abordar os principais tópicos relacionados às técnicas de armazenamento e transportes dos testículos e epidídimos, bem como a recuperação dos espermatozoides epididimários de diferentes espécies de mamíferos.

ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMÁRIOS

O epidídimo consiste de um longo ducto, altamente contorcido, que conecta os ductulos eferentes ao ducto deferente. Dependendo da espécie, o comprimento do ducto epididimário pode variar de 3-4 metros, na espécie humana, até 80 metros como nos equinos. Morfológicamente, o epidídimo é geralmente dividido em três regiões: cabeça, corpo e cauda (Oliva et al., 2009).

Em um mamífero adulto, consiste em um ducto longo e enovelado revestido por epitélio pseudoestratificado, como observado para o coelho (Nicander, 1957), carneiro, touro e cavalo (Nicander, 1958), rato (Hamilton, 1975), cão (Orsi, 1983), hamster (Vicente & Orsi, 1987), gato (Viotto et al., 1988) e cuica (Martinelli & Nogueira, 1992).

Nos mamíferos, o epidídimo possui diversas funções, ressaltando-se a reabsorção dos fluidos oriundos dos túbulos seminíferos, promovendo a concentração e o transporte espermáticos, a eliminação dos espermatozoides defeituosos, bem como a maturação e o armazenamento dos normais. A função de armazenamento é ilustrada pelo fato dos espermatozoides ejaculados sobreviverem por cerca de 24 horas fora do epidídimo em meio diluidor; enquanto que os que são mantidos na cauda do epidídimo (*in vivo*) permanecem com boa viabilidade por mais de 15 dias (Muradás et al., 2006).

Esta viabilidade é baseada na manutenção do metabolismo com baixa atividade, prevenindo a ativação prematura dos espermatozoides. Durante o armazenamento, o epidídimo acumula espermatozoides que podem ou não ser utilizados na cópula. O volume da cauda do epidídimo reflete a capacidade de armazenamento de espermatozoides do macho. Em touros e garanhões, o número de espermatozoides armazenados na cauda do epidídimo pode ser suficiente para até 10 ejaculações sucessivas, dependendo da idade,

tamanho e atividade reprodutiva do animal (Bedford, 1994).

COLHEITA DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMÁRIOS

A colheita de espermatozoides viáveis do epidídimo tem sido relatada nos suínos (Kikuchi et al., 1998), bovinos (Martins et al., 2009), ovinos (Lone et al., 2011; Tamayo-Canul et al., 2011), cervídeos (Martinez-Pastor et al., 2005ab, 2006; Fernández-Santos et al., 2009; Ake-Lopez et al., 2010), felinos (Titarelli et al., 2006; Gañán et al., 2009; Jiménez et al., 2011), caninos (Yu & Leibo, 2002; Ponglowhapan et al., 2006; Titarelli et al., 2006; Melo et al., 2008; Ponglowhapan & Chatdarong, 2008; Martins et al., 2009), equinos (Papa et al., 2008; Heise et al., 2010), asininos (Contri et al., 2012), camelos (Waheed et al., 2011), cutias (Silva et al., 2011), esquilos (Ping et al., 2011) e antílopes (Chatiza et al., 2011).

Muradás et al. (2006) demonstraram que o número total de espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo de garanhões é superior ao encontrado em ejaculados. Além disso, estas células apresentam motilidade progressiva igual ou superior aos espermatozoides do ejaculado (Tiplady et al., 2002).

O objetivo geral da obtenção de espermatozoides viáveis do epidídimo é a sua utilização em técnicas de reprodução assistida, como inseminação artificial (Papa et al., 2008; Heise et al., 2010) e injeção intracitoplasmática de espermatozoides (Herrera et al., 2006).

Muitos métodos de recuperação são descritos e variam dependendo do autor e da espécie animal (Quadro 1). Nos animais de companhia, devido ao

tamanho do epidídimo, o método de preferência é o fatiamento que consiste em cortar ou fatiar a cauda do epidídimo e deixar repousar em um meio diluidor, desta maneira, os espermatozoides migram para o meio e são recuperados através de filtração (Yu & Leibo, 2002). Esta técnica também é usada para obter amostras de espermatozoides dos animais de produção (Hishinuma et al., 2003).

Uma técnica similar consiste em fazer numerosos cortes na cauda do epidídimo de carneiros e pressionar suavemente a cauda e coletar os espermatozoides por extravasamento do líquido epididimário (Kaabi et al., 2003). Bartels et al. (2000) relataram que outra possibilidade é usar uma agulha e perfurar os túbulos do epidídimo de leões. Kishikawa et al. (1999) utilizaram pinças para comprimir a cauda do epidídimo de camundongos e recuperar os espermatozoides.

Outro método consiste em promover um fluxo retrógrado na cauda do epidídimo aplicando pressão aos vasos deferentes até que o conteúdo da cauda saia através de um corte feito na junção com o corpo do epidídimo (Garde et al., 1994). A pressão é gerada com uma seringa, que injeta ar ou algum diluente inócuo aos espermatozoides (Lambrechts et al., 1999).

Segundo Martinez-Pastor et al. (2006), a colheita de espermatozoides da cauda do epidídimo através do fluxo retrógrado é a técnica mais indicada, pois as amostras obtidas apresentam um menor nível de contaminação e são de melhor qualidade em relação aos outros métodos. Por outro lado, essa técnica possui a limitação de ser usada comumente para animais de produção devido ao tamanho do epidídimo e de ser mais complexa que as outras técnicas.

Quadro 1: Métodos de recuperação de espermatozoides epididimários nos mamíferos.

Métodos de recuperação de espermatozoides epididimários	Espécie	Autores
Fatiamento	Camundongos	Sankai et al., 2001; Kato et al., 2002
	Bovinos	Martins et al., 2009
	Caprinos	Martinez-Pastor et al., 2005b
	Asininos	Contri et al., 2012
	Cervos	Martinez-Pastor et al., 2005ab
	Caninos	Yu & Leibo, 2002; Martins et al., 2003
	Felinos	Titarelli et al., 2006; Gañán et al., 2009; Jiménez et al., 2011
	Camelos	Waheed et al., 2011
	Esquilos	Ping et al., 2011
	Antílope	Saragusty et al., 2006
Flutuação	Ovinos	Lone et al., 2011
Lavagem retrógrada	Caninos	Ponglowhapan et al., 2006
	Antílope	Chatiza et al., 2011
	Suínos	Kikuchi et al., 1998
	Equinos	Bruemmer et al., 2002; James et al., 2002; Tiplady et al., 2002; Neild et al., 2006; Papa et al., 2008; Heise et al., 2010
	Ovinos	Garde et al., 1994
	Cutias	Silva et al., 2011
Perfuração	Leões	Bartels et al., 2000

TRANSPORTE DO COMPLEXO TESTÍCULO EPIDÍDIMO EPIDIDIMÁRIO

Pesquisas têm avaliado a viabilidade espermática em função do tempo de armazenamento do epidídimo possibilitando, assim, a definição das melhores formas de acondicionamento e transporte do material até um centro de reprodução capacitado para a recuperação e criopreservação destas células (James et al., 2002; Granemann et al., 2006; Muradás et al., 2006).

Os epidídimos podem ser transportados refrigerados para laboratórios de andrologia ou, ainda, processados no próprio local por um técnico especializado (Bruemmer et al., 2002). Espermatozoides que são recuperados de epidídimos refrigerados a 5 °C por 24 horas têm apresentado boa congelabilidade em diferentes espécies (Marks et al., 1994; Blash et al., 2002; Soler et al., 2003).

Pesquisas conduzidas com complexo testículo-epidídimo que foram mantidos em temperatura ambiente por até 5 horas, não detectaram grandes alterações na motilidade espermática (Schäfer & Holzmann, 2000). Resultados semelhantes foram obtidos mantendo-se os mesmos sob refrigeração a 5 °C *overnight* (Goodrowe & Hay, 1993). Estudos conduzidos para a recuperação de espermatozoides do epidídimo de cães utilizando a solução de Ringer sem lactato mostraram que essa solução é eficiente para a recuperação das células espermáticas (Martins et al. 2003); a solução fisiológica 0,9% também tem se mostrado eficiente para esse propósito nos cães e nos gatos (Martins et al., 2006).

Estudos realizados em cães demonstraram que não há um decréscimo significativo na integridade das membranas e do acrossomo em espermatozoides provenientes do epidídimo quando armazenado por 48 horas a 4 °C. Em contraste, foi observado que a motilidade espermática diminuiu significativamente nas primeiras 5 horas de refrigeração; após esse período o decréscimo foi mais lento. Neste estudo, alguns espermatozoides recuperados do epidídimo apresentaram motilidade e capacidade de ligação à zona pelúcida após um período de armazenamento de oito dias à temperatura de 4 °C. (Yu & Leibo, 2002).

Resultados da avaliação *in vitro* demonstraram que a concentração de espermatozoides

recuperados do epidídimo é semelhante àquelas descritas, na espécie canina, no ejaculado (Johnston et al., 2001). No entanto, a falta de conhecimento técnico específico sobre o armazenamento e transporte do epidídimo, muitas vezes inviabiliza a preservação espermática em decorrência da degeneração tecidual pós-morte na espécie equina (James et al., 2002).

QUALIDADE DOS ESPERMATOZOIDES COLHIDOS DA CAUDA DO EPIDÍDIMO

Martinez-Pastor et al. (2005b) pesquisaram os efeitos do tempo *post mortem* (até quatro dias) sobre o complexo testículo epididimário cervídeos resfriado a 5 °C e observaram boa qualidade seminal (motilidade 40% e morfologia 60%) por até 72 horas pós-refrigeração permitindo o seu uso em programas de inseminação artificial.

Kaabi et al. (2003) estudaram os efeitos do intervalo entre a morte de carneiros e a recuperação de seus espermatozoides da cauda do epidídimo armazenada à temperatura ambiente e à 5 °C (0, 24 e 48 horas), sobre a qualidade e capacidade de fecundação dos espermatozoides. Eles observaram que as amostras se mantiveram viáveis por até 24 e 48 horas após a morte dos animais, para epidídimos armazenados em temperatura ambiente e resfriados, respectivamente; contudo a qualidade diminuiu significativamente após esses períodos. Epidídimos conservados a 5 °C tinham melhor motilidade espermática e maior porcentagem de espermatozoides morfológicamente normais do que os armazenados à temperatura ambiente por mais de 24 horas. A capacidade de fecundação dos espermatozoides obtidos da cauda do epidídimo até 24 horas *post mortem* foi semelhante à do ejaculado.

Kato et al. (2002) colheram espermatozoides da cauda do epidídimo de camundongos e os espermatozoides foram incubados em meio diluidor (Ringer-Krebs bicarbonato modificado) em estufa de CO₂ a 37 °C e avaliaram sua motilidade e integridade do acrossoma, 1, 3 e 5 horas, pós-orquiectomia e observaram queda significativa da motilidade após 5 horas e nenhuma alteração significativa da integridade acrossômica.

A colheita de espermatozoides da cauda do epidídimo em garanhões mostrou-se eficiente na recuperação de células espermáticas viáveis (James et al., 2002; Tiplady et al., 2002; Melo et al., 2008; Papa et al., 2008). Bruemmer et al. (2002) observaram que não existem diferenças significativas na motilidade de espermatozoides epididimários de garanhões, avaliados logo após a orquiectomia e 24 horas depois, desde que o epidídimo seja mantido resfriado a 5 °C. James et al. (2002) demonstraram que espermatozoides epididimários viáveis de garanhões podem ser colhidos por até 96 horas *post mortem*, desde que testículos/epidídimos sejam mantidos resfriados a 4 °C. Neste estudo não houve diferença no percentual de motilidade progressiva e na integridade de membrana avaliados após a refrigeração por 96 horas.

Em cervídeos, Martinez-Pastor et al. (2005a) avaliaram os parâmetros espermáticos em função do tempo *post mortem*, observando valores satisfatórios até 48 horas, por 5°C. Os autores constataram ainda que o parâmetro espermático mais afetado durante o armazenamento foi a motilidade espermática. Estudos com ratos, caprinos, equinos e bovinos demonstraram que a maioria destas espécies possui melhor viabilidade seminal quando os testículos são armazenados entre 4 e 5 °C, comparados com os mantidos à temperatura ambiente (James, 1997).

Após 24 horas pós-orquiectomia a temperatura ambiente, os espermatozoides epididimários de garanhões tiveram uma redução na qualidade espermática. Este decréscimo pode ser explicado pelo esgotamento metabólico dos espermatozoides, assim como, pelo processo de degeneração tecidual *post mortem*. Temperaturas mais baixas retardam o processo de degeneração, pois diminuem o metabolismo dos espermatozoides mantendo-os viáveis por mais tempo (Granemann et al., 2006).

Outros estudos avaliaram a viabilidade espermática após o armazenamento do epidídimo a 5 °C por 24 horas. Estes estudos realizados em cervídeos (Soler et al., 2003), canídeos (Marks et al., 1994) e equídeos (Bruemmer et al., 2002; Papa et al., 2008) demonstraram que os espermatozoides recuperados foram processados e congelados com sucesso. No entanto, poucos estudos compararam a fertilidade destes espermatozoides com a dos espermatozoides do ejaculado.

CONGELAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMÁRIOS

Os processos de congelação e descongelação podem provocar danos na capacidade de motilidade e fecundação por alterações na membrana plasmática do espermatozoide (Watson, 1995). Uma das alterações da membrana ocorre devido a lavagens ou diluições que podem remover proteínas da membrana plasmática, mudando assim a composição das mesmas (Hammerstedt et al., 1990; Collin & Bailey, 1999). As proteínas, quando removidas, podem modificar a relação dos lipídios impedindo o processo de reação acrossômica. A estabilidade de lipídios na membrana plasmática é pré-requisito para manter a função do espermatozoide (Watson, 1995). Enquanto a congelação feita em condições adequadas (velocidade de abaixamento de temperatura e uso de crioprotetores) evita a formação de grandes cristais de gelo intracelular, ela leva a um aumento dos danos por efeitos de solução. Portanto, a taxa de congelação para um dado tecido depende de sua tolerância relativa ao dano causado pelos cristais de gelo e da toxicidade dos efeitos de solução (Hafez & Hafez, 2004).

Soler et al. (2003) demonstraram os efeitos da viabilidade e fertilidade de espermatozoides epididimários criopreservados e descongelados de cervídeos, em diferentes protocolos de descongelação (37 °C por 20 segundos; 60 °C por 8 segundos; 70 °C por 5 segundos), o referido autor observou que o primeiro protocolo de descongelação foi o mais adequado, pois apresentou melhor motilidade espermática (76,8%).

Kikuchi et al. (1998) pesquisaram a influência do tempo *post mortem* na motilidade e capacidade de fertilização *in vitro* e calcularam os oócitos maduros, oócitos penetrados e com pró-núcleo masculino de espermatozoides epididimários de cachacos orquectomizados, sendo os espermatozoides criopreservados logo após a orquiectomia, no grupo controle e 24, 48 e 72 horas após, sendo estes espermatozoides mantidos resfriados a 4 °C em meio *Niwa and Sasaki Freezing*, sendo o grupo controle, espermatozoides ejaculados criopreservados. A motilidade dos espermatozoides criopreservados até 48 horas pós-orquiectomia não diferiu do

grupo controle, já a capacidade de fecundação foi significativamente menor, com boa viabilidade nos espermatozoides criopreservados até 24 horas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A recuperação de espermatozoides epididimários pode ser uma alternativa para resgatar o

potencial reprodutivo de alguns animais, sejam eles domésticos ou selvagens. Dessa maneira, é de crucial importância não somente o domínio da técnica de colheita dos espermatozoides epididimários, mas também o transporte e a conservação desses gametas para que eles estejam viáveis para uma utilização futura com sucesso.

AGRADECIMENTOS

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pela concessão da bolsa de estudos do doutorando Antônio Cavalcante Mota Filho, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de pesquisadora à Lúcia Daniel Machado da Silva e apoio financeiro para o desenvolvimento das pesquisas do Laboratório de Reprodução de Carnívoros.

REFERÊNCIAS

- Ake-Lopez J., Cavazos-Arizpe E., Magana-Monforte J.G., Centurion-Castro F. & Silva-Mena C. 2010. Effect of age and postmortem time on some white-tailed deer (*Odocoileus virginianus texanus*) epididymal sperm characteristics and response of cryopreservation. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*. 5:183-186.
- Axnér E., Hermansson U. & Linde-Forsberg C. 2004. The effect of Equex STM paste and sperm morphology on post-thaw survival of cat epididymal spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 84:179-191.
- Bartels P., Lubbe K., Kilian I., Friedman Y., Van Dick G. & Mortimer D. 2000. In vitro maturation and fertilization of lion (*Panthera leo*) oocytes using frozen-thawed epididymal spermatozoa recovered by cauda epididymectomy of an immobilized lion. *Theriogenology*. 53:325.
- Bedford J.M. 1994. The status and the state of the human epididymis. *Human Reproduction*. 9:2187-2199.
- Blash S., Melican D. & Gavin W. 2002. Cryopreservation of epididymal sperm obtained at necropsy from goats. *Theriogenology*. 54:899-905.
- Bruemmer J.E., Reger H., Zibinski G. & Squires E.L. 2002. Effect of storage at 5°C on the motility and cryopreservation of stallion epididymal spermatozoa. *Theriogenology*. 58:405-407.
- Chatiza F.P., Pieterse G.M., Bartels P. & Nedambale T.L. 2011. Characterization of epididymal spermatozoa motility rate, morphology and longevity of springbok (*Antidorcas marsupialis*), impala (*Aepyceros melampus*) and blesbok (*Damaliscus dorcas phillipsi*): Pre- and post-cryopreservation in South Africa. *Animal Reproduction Science*. 126:234-244.
- Collin S. & Bailey J.L. 1999. Assessment of intracellular calcium levels in cryopreserved bovine sperm by flow cytometry. *Theriogenology*. 51:341.
- Contri A., Gloria A., Robbe D., I. De Amicis I & Carluccio A. 2012. Characteristics of donkey spermatozoa along the length of the epididymis. *Theriogenology*. 77:166-173.
- Fernández-Santos M.R., Martínez-Pastor F., Matias D., Domínguez-Rebolledo A.E., Estes M.C., Montoro V. & Garde J.J. 2009. Effects of long-term chilled storage of red deer epididymides on DNA integrity and motility of thawed spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 111:93-104.
- Gañán N., Gomendio M. & Roldan E.R.S. 2009. Effect of storage of domestic cat (*Felis catus*) epididymides at 5°C on sperm quality and cryopreservation. *Theriogenology*. 72:1268-1277.
- Garde J., Aguado M., Pérez S., Garrido D., Pérez-Guzmán M. & Montoro V. 1994. Physiological characteristics of epididymal spermatozoa from postmortem rams. *Theriogenology*. 41:203.
- Goodrowe K.L. & Hay M. 1993. Characteristics and zona binding ability of fresh and cooled domestic cat epididymal spermatozoa. *Theriogenology*. 40:967-975.
- Granemann L.C., Weiss R.R., Kozicki L.E., Muradás P.R. & Treml T.E. 2006. Número total de espermatozoides de garanhões obtidos através da colheita com vagina artificial e por fluxo retrógrado da cauda do epidídimo. *Archives of Veterinary Science*. 11:73-77.

- Hafez, E.S.E. & Hafez, B. 2004. Reprodução Animal. Editora Manole. 7^{ed}. p. 381-470.
- Hamilton D.W. 1975. Structure and function of the epithelium lining the ductuli efferentes; ductus epididymis and ductus deferens in the rat, p. 259-301. In: Hamilton, D.W. & Greep, R.O. (ed.) Handbook of Physiology. V. 5. Washington D.C.: American Physiological Society.
- Hammerstedt R.H., Graham J.K. & Nolan, J.P. 1990. Cryopreservation of mammalian sperms: what we ask them to survive. Journal of Andrology. 11:73-88.
- Heise A., Kähn W., Volkmann D.H., Thompson P.N. & Gerber D. 2010. Influence of seminal plasma on fertility of fresh and frozen-thawed stallion epididymal spermatozoa. Animal Reproduction Science. 118:48-53.
- Herrera C., Miragaya H.M., Conde P., Hynes V., Losinno L., Quintans C. & Pasqualini R.S. 2006. Intracytoplasmic injection of in vitro-matured equine oocytes with frozen-thawed epididymal sperm. Animal Reproduction Science. 94:299-302.
- Hewitt D.A., Leahy R., Sheldon I.M. & England G.C. 2001. Cryopreservation of epididymal dog sperm. Animal Reproduction Science. 67:101-111.
- Hishinuma M., Suzuki K. & Sekine, J. 2003. Recovery and cryopreservation of sika deer (*Cervus nippon*) spermatozoa from epididymides stored at 4 °C. Theriogenology. 59:813-820.
- James A.N. 1997. Preservation of sperm harvested from the rat, caprine, equine and bovine epididymis. Tese da Graduate Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College. 234p.
- James A.N., Green H., Hoffman S., Landry A.M., Paccamonti D. & Godke R.A. 2002. Preservation of equine sperm stored in the epididymis at 4 °C for 24, 48, 72 and 96 hours. Theriogenology. 58:401-404.
- Jiménez E. C.C. Pérez-Marín, Y. Millán & E. Agüera. 2011. Influence of anaesthetic drugs on the epididymal sperm quality in domestic cats. Animal Reproduction Science. 123:265-269.
- Johnston S.D., Kustritz M.V.R. & Oslon P.N.S. 2001. Semen collection, evaluation and preservation, p. 287-306. In: Johnston S.D., Kustritz M.V.R. & Oslon P.N.S. (ed.) Canine and Feline Theriogenology. WB Saunders, Philadelphia.
- Kato, M., Makino, S., Kimura, H., Ota, T., Furuhashi, T., Nagamura, Y & Hirano, K. 2002. *In vitro* evaluation of acrosomal status and motility in rat epididymal spermatozoa treated with α -chlorohydrin for predicting their fertilizing capacity. Journal of Reproduction and Development. 48:461-468.
- Kikuchi, K., Nagai, T., Kashiwazaki, N., Ikeda, H., Noguchi, J & Shimada, A. 1998. Criopreservation and ensuing in vitro fertilization ability of boar spermatozoa from epididymides stored at 4°C. Theriogenology. 50:615-623.
- Kishikawa, H., Tatenno, H & Yanagimachi, R. 1999. Fertility of mouse spermatozoa retrieved from cadavers and maintained at 4°C. Journal of Reproduction and Fertility. 116:217-222.
- Kolbe, T & Holtz, W. 1999. Intracytoplasmic injection (ICSI) of in vivo or in vitro matured oocytes with fresh ejaculated or frozen-thawed epididymal spermatozoa and additional calcium-ionophore activation in the pig. Theriogenology. 52:671-682.
- Kaabi M., Paz P., Alvarez M., Anel E., Boixo J.C., Rouissi H., Herraes P. & Anel L. 2003. Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. Theriogenology. 60:1249-1259.
- Lambrechts, H., Niekerk, F., Coetzer, F.W., Cloete, S & Van der Horst, G. 1999. The effect of cryopreservation on the survivability, viability and motility of epididymal African buffalo (*Syncerus caffer*) spermatozoa. Theriogenology. 52:1241-1249.
- Lone F.A., R. Islam, M.Z. Khan & K.A. Sofi. 2011. Effect of transportation temperature on the quality of cauda epididymal spermatozoa of RAM. Animal Reproduction Science. 123:54-59.
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Marks,S.L.,Dupuis,J.,Mickelsen,W.D.,Memon,M.A.&Platz,C.C.Jr.1994.Conceptionbyuseofpostmortemepididymalsemenextractioninadog.JournalofAmericanVeterinaryMedicalAssociation.15:1639-1640.>
- Martinelli, P. M & Nogueira, J. C. 1992. Epididymal morphology in the south American marsupial *Marmosa cinerea*, Temminck, 1824. Revista Brasileira de Ciências Morfológicas. 9:26-31.
- Martinez-Pastor, F., Corujo, A.R.D., Anel, E., Herraes, P., Paz, P & Anel, L. 2005a. Post mortem time and season alter subpopulation characteristics of Iberian red deer epididymal sperm. Theriogenology. 64:958-974.
- Martinez-Pastor, F., Guerra, C., Kaabi, M., Diaz, A.R., Anel, E., Herraes, P., Paz & P., Anel, L. 2005b. Decay of sperm obtained from epididymes of wild ruminants depending on postmortem time. Theriogenology. 63:24-40.
- Martinez-Pastor, F., Garcia-Macias, V., Alvarez, M., Chamorro, C., Herraes, P., Paz, P & Anel, L. 2006. Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer. Theriogenology. 65:471-485.
- Martins, C.F., Rumpf, R., Pereira D.C & Dode, M.N. 2007. Cryopreservation of epididymal bovine spermatozoa from dead animals and its uses *in vitro* embryo production. Animal Reproduction Science. 101:326-331.

- Martins, C.F., Driessen, K., Costa, P.M., Carvalho-Neto, J.O., Sousa, R.V., Rumpf, R. & Dode, M.N. 2009. Recovery, cryopreservation and fertilization potential of bovine spermatozoa obtained from epididymides stored at 5 °C by different periods of time. *Animal Reproduction Science*. 116:50-57.
- Martins, M.I.M.; Souza, F.F.; Chirinéa, V.H.; Tebet, J.M & Lopes M.D. 2003. Viabilidade de espermatozoides criopreservados, obtidos do epidídimo de cães. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 27:367-368.
- Martins, M.I.M., Justino, R.C., Pereira, F.D., Perches, C.S., Chirinéa, V.H & Lopes, M.D. 2006. The effect of two solutions in the morphological characteristics and in the freezing of spermatozoa obtained from epidymis of dogs and cats: preliminary results. *Animal Reproduction*. 3:265.
- 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. 2008. Comparison of three different extenders for freezing epididymal stallion sperm. *Animal Reproduction Science*. 107:331.
- Muradás, P.R., Weiss, R.R., Kozicki, L.E., Granemann, L.C., Santos, I.W & Pimpão, C.T. 2006. Alguns parâmetros de viabilidade de espermatozoides equinos colhidos por vagina artificial e por lavagem da cauda do epidídimo. *Archives of Veterinary Science*. 11:69-74.
- Neild, D., Miragaya, M., Chaves, G., Pinto, M., Alonso, A., Gambarotta, M., Losinno, L & Agüero, A., 2006. Cryopreservation of cauda epididymis spermatozoa from slaughterhouse testicles 24 hours after ground transportation. *Animal Reproduction Science*. 94:92-95.
- Nicander, L. 1957. On the regional histology and cytochemistry of the epididymis in the rabbits. *Acta Morphologica Neerland Scandinava*. 1:99-118.
- Nicander, L. 1958. Studies on the regional histology and cytochemistry of the ductus epididymidis in stallions, rams and bulls. *Acta Morphologica Neerland Scandinava*. 1:337-362.
- Oates, R.D., Lobel, S.M., Harris, D.H., Pang, S., Burgess, C.M & Carson, R.S. 1996. Efficacy of intracytoplasmic sperm injection using intentionally cryopreserved epididymal spermatozoa. *Human Reproduction*. 11:133-138.
- Oliva, S. U., Rinaldo P. A & Stumpp, T. 2009. Biologia epididimária: Maturação espermática e expressão gênica. *O Mundo da Saúde*. 33:419-425.
- Orsi, A. M. 1983. Regional histology of the epididymis of the dog. A light microscope study. *Anatomischer Anzeiger*. 153:441-445.
- Papa, F.O., Melo, C.M., Fioratti, E.G., Dell'Aqua Jr., J.A., Zahn, F.S & Alvarenga, M.A. 2008. Freezing of stallion epididymal sperm. *Animal Reproduction Science*. 107:293-301.
- Ping S., Wang F., Zhang F., Wu C., Tang W., Luo Y. & Yang S. 2011. Cryopreservation of epididymal sperm in tree shrews (*Tupaia belangeri*). *Theriogenology*. 76:39-46.
- Ponglowhapan S. & Chatdarong K. 2008. Effects of Equex STM Paste on the quality of frozen-thawed epididymal dog spermatozoa. *Theriogenology*. 69:666-672.
- Ponglowhapan S., Chatdarong K., Sirivaidyapong S., Lohachit C. 2006. Freezing of epididymal spermatozoa from dogs after cool storage for 2 or 4 days. *Theriogenology*. 66:1633-1636.
- Sankai, T., Tsuchiya, H. & Ogonuki, N. 2001. Short-term nonfrozen storage of mouse epididymal spermatozoa. *Theriogenology*. 55:1759-1768.
- Santiago-Moreno J., Toledano-Díaz A., Pulido-Pastor A., Dorado J., Gómez-Brunet A. & López-Sebastián A. 2006. Effect of egg yolk concentration on cryopreserving Spanish ibex (*Capra pyrenaica*) epididymal spermatozoa. *Theriogenology*. 66:1219-1226.
- Saragusty J., Gacitua H., King R. & Arav A. 2006. Post-mortem semen cryopreservation and characterization in two different endangered gazelle species (*Gazella gazella* and *Gazella dorcas*) and one subspecies (*Gazella gazelle acaiae*). *Theriogenology*. 66:775-784.
- Schäfer S. & Holzmann A. 2000. The use of transmigration and Spermac® stain to evaluate epididymal cat spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 59:201-211.
- Silva M.A., G.C.X. Peixoto, E.A.A. Santos, T.S. Castelo, M.F. Oliveira & A.R. Silva. 2011. Recovery and cryopreservation of epididymal sperm from agouti (*Dasiprocta aguti*) using powdered coconut water (ACP-109c) and Tris extenders. *Theriogenology*. 76:1084-1089.
- Soler, A.J., Garcia, A.J., Fernández-Santos, M.R., Estes, M.C & Garde, J.J. 2003. Effects of thawing procedure on postthawed in vitro viability and in vivo fertility of Red deer epididymal spermatozoa cryopreserved at -196°C. *Journal of Andrology*. 24:746-756.
- Tamayo-Canul J., Alvarez M., López-Urueña E., Nicolas M., Martinez-Pastor F., Anel E., Anel L. & de Paz P. 2011. Undiluted or extended storage of ram epididymal spermatozoa as alternatives to refrigerating the whole epididymes. *Animal Reproduction Science*. 126:76-82.
- Tebet J., Martins M.I.M., Chirinéa V.H., Souza F.F., Campagnol D & Lopes M.D. 2006. Cryopreservation effects on domestic cat epididymal versus electroejaculated spermatozoa. *Theriogenology*. 66:1629-1632.

- Tiplady C.A., Morris L.H.A & Allen W.R. 2002. Stallion epididymal spermatozoa: pre-freeze and post-thaw motility and viability after three treatments. *Theriogenology*. 58:225-228.
- Tittarelli C., Savignone C.A., Arnaudín E., Stormelli M.C., Stormelli M.A & de la Sota R.L. 2006. Effect of storage media and storage time on survival of spermatozoa recovered from canine and feline epididymides. *Theriogenology*. 66:1637-1640.
- Tsutsui T., Wada M., Anzai M & Hori T. 2003. Artificial insemination with frozen epididymal sperm in cats. *Journal of Veterinary Medical Science*. 65:397-399.
- Vicentini C.A & Orsi A.M. 1987. Histologia regional do epidídimo no hamster champanha (*Mesocricetus auratus*). *Revista Brasileira de Biologia*. 47:277-281.
- Viotto M.J.S., Orsi A.M., Mello Dias S., Fernandez W.A & Camilli J.A. 1988. Histologia regional do epidídimo do gato (*Felis domestica*, L.). *Ciência e Cultura*. 40:1195-1199.
- Waheeda M.M., Al-Eknah M.M. & El-Bahr M.M. 2011. Some biochemical characteristics and preservation of epididymal camel spermatozoa (*Camelus dromedarius*). *Theriogenology*. 76:1126-1133.
- Watson P.F. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*. 7:871-891.
- Yu I. & Leibo S. 2002. Recovery of motile, membrane-intact spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4 °C. *Theriogenology*. 57:1179-1190.

6. CAPÍTULO 01

REFRIGERAÇÃO DO EPIDÍDIMO CANINO A 4°C E RECUPERAÇÃO DOS ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMÁRIOS UTILIZANDO ACP-106C

Periódico : *Publicado na Pesquisa Veterinaria Brasileira A2*

Trabalho 3158 MF

Refrigeração do epidídimo canino a 4°C e recuperação dos espermatozoides epididimários utilizando ACP-106c¹

Antonio C. Mota Filho^{2*}, Herlon V. R. Silva², Luana A. Freitas², Thalles G. P. Nunes², Airton A. Araújo³
e Lúcia D.M. Silva²

ABSTRACT.-Mota Filho A.C., Silva H.V.R., Freitas L.A., Nunes T.G.P., Araújo A.A. & Silva L.D.M. [Cooling of the canine epididymis at 4° C and recovery of epididymal sperm using ACP-106c.] Refrigeração do epidídimo canino a 4° C e recuperação dos espermatozoides epididimários utilizando ACP-106c. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Laboratório de Reprodução de Carnívoros, Universidade Estadual do Ceará, Campus do Itaperi, Av. Paranjana 1700, Itaperi, Fortaleza, CE 60740-903, Brazil. E-mail: acmfmedvet@hotmail.com

This study aimed to assess the quality of sperm recovered from the epididymal cauda after cooling the complex testis-epididymis (CTE) of dogs using ACP-106c extender. Sixty adult male dogs, weighing 10-20 kg were used. After euthanasia, CTE was removed and it was immersed in 0.9% saline and transported to the laboratory in cooler at 30°C. For cooling and recovery of epididymal spermatozoa, the 60 pairs of CTE were divided into four groups, according to the refrigeration time of the CTE and subsequent sperm recovery: G0h, G6h, G12h and G18h, wherein each pair of CTE remained zero, six, 12 or 18 hours at 4°C respectively. The recovery of sperm epididymal tail was conducted by flotation technique using ACP-106c or Tris extender. For each epididymis, it was added 1.0 mL of either extenders, preheated to 37°C for 5 minutes. They were then centrifuged at 800g/5 minutes to remove the cell debris. Morphology, functionality and total and progressive motility, and parameters obtained by CASA were evaluated. Data were analyzed by ANOVA followed by Turkey test ($P < 0.05$). In all parameters assessed, there was no difference between the extenders used ($P > 0.05$). The values of total motility groups G0h, G6h, G12h, and G18h for ACP-106c were 84.4 ± 7.7 , 81.6 ± 11.6 , 88.3 ± 6.5 and 69.5 ± 16.9 respectively, and for Tris 85.2 ± 8.7 , 77.4 ± 14.3 , 79.0 ± 17.8 and 65.4 ± 17.9 respectively. A decrease in sperm quality was observed after 18 hours of cooling in both extenders. Thus it can be concluded that the ACP-106c may be used to recover the epididymal spermatozoa chilled and may be viable for up to 12h cooling.

INDEX TERMS: Refrigeration, epididymis, dogs.

¹ Recebido em 23 de fevereiro de 2013.

Aceito para publicação em

² Laboratório de Reprodução de Carnívoros, Universidade Estadual do Ceará (UECE), Campus do Itaperi, Av. Paranjana 1700, Itaperi, Fortaleza, CE 60740-903, Brasil. *Autor para correspondência: acmfmedvet@hotmail.com

³ Faculdade de Zootecnia, UECE, Campus do Pici, Av. Mister Hull 2977, Fortaleza, CE 60021-970.

RESUMO.-Mota Filho A.C., Silva H.V.R., Freitas L.A., Nunes T.G.P., Araújo A.A. & Silva L.D.M. 2013. Objetivou-se avaliar a qualidade dos espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo após a refrigeração do complexo testículo-epidídimo (CTE) de cães usando o diluidor ACP-106c. Foram utilizados 60 cães machos adultos, com peso de 10-20 kg. Após a eutanásia, removeu-se o CTE que foi imerso em solução fisiológica 0,9% e transportado em caixa térmica ao laboratório a 30°C. Para a refrigeração e recuperação dos espermatozoides epididimários, os 60 pares do CTE foram divididos em 4 grupos, de acordo com o tempo de refrigeração do CTE e posterior recuperação espermática: G0h, G6h, G12h e G18h, em que cada par do CTE permaneceu por zero, seis, doze ou dezoito horas a 4°C, respectivamente. A recuperação dos espermatozoides da cauda do epidídimo foi realizada pela técnica de

flutuação utilizando-se o diluidor ACP-106c ou Tris. Para cada epidídimo foi adicionado 1,0 mL de um dos dois diluidores, pré-aquecidos a 37°C por 5 minutos. Em seguida foram centrifugados a 800g/5 minutos para remoção dos resíduos celulares. Avaliou-se a morfologia, funcionalidade e motilidade espermática total e progressiva, além de parâmetros obtidos pelo CASA. Os dados foram submetidos à ANOVA seguido do teste de Turkey ($P < 0,05$). Em todos os parâmetros avaliados, não houve diferença entre os diluidores testados ($P > 0,05$). Os valores de motilidade total nos grupos G0h, G6h, G12h, e G18h para o ACP-106c foram $84,4 \pm 7,7$; $81,6 \pm 11,6$; $88,3 \pm 6,5$ e $69,5 \pm 16,9$, respectivamente, e para o Tris $85,2 \pm 8,7$; $77,4 \pm 14,3$; $79,0 \pm 17,8$ e $65,4 \pm 17,9$, respectivamente. Um decréscimo na qualidade espermática foi observado após 18 horas de refrigeração em ambos os diluidores. Dessa forma pode-se concluir que o ACP-106c pode ser utilizado para recuperar os espermatozoides epididimários refrigerados e podem ser viáveis por até 12h de refrigeração.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Refrigeração, epidídimo, cães.

INTRODUÇÃO

A recuperação de espermatozoides da cauda do epidídimo pode ser uma alternativa importante na reprodução canina (Hewitt et al. 2001). É uma biotécnica reprodutiva valiosa em casos de animais de companhia que possuem um valor comercial, zootécnico e afetivo elevado, que por algum motivo necessitem ser esterilizados, sacrificados ou que morram inesperadamente, já que os espermatozoides obtidos por esta técnica são morfologicamente viáveis e retêm a capacidade de sofrer capacitação, ligar-se à zona pelúcida e fertilizar o oócito (Goodrowe & Hay 1993, Luvoni et al. 2003, Tsutsui et al. 2003).

Estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de armazenar os testículos e os epidídimos em garanhões (Bruemmer et al. 2002, James et al. 2002, Heise et al. 2010), cães (Yu & Leibo 2002), touros (Martins et al. 2009), burros (Contri et al. 2011) e carneiros (Lone et al. 2011, Tamayo-Canul et al. 2011). Tais estudos têm o objetivo de adequar um protocolo que possibilite a retirada do complexo testículo-epidídimo (CTE) e seu posterior acondicionamento em sistemas de transporte para seu envio a laboratórios especializados para processamento, refrigeração e criopreservação dos espermatozoides.

Pesquisas conduzidas com CTE que foram mantidos em temperatura ambiente por até 5 horas não detectaram grandes alterações na motilidade espermática em gatos (Schäfer & Holzmann, 2000). Resultados semelhantes foram obtidos mantendo CTE de gatos sob refrigeração a 5°C *overnight* (Goodrowe & Hay, 1993). No entanto, há poucas informações acerca da recuperação de espermatozoides epididimários caninos mantidos sob refrigeração. Não há ainda trabalhos sobre a refrigeração de epidídimos de cães e posterior recuperação dos espermatozoides para avaliação *in vitro* da viabilidade espermática, visando à inseminação artificial.

Para recuperação e conservação da célula espermática faz-se necessário o emprego de um meio diluidor. O Tris é um diluidor que já se mostrou eficiente para conservação de espermatozoide epididimário canino (Hewitt et al. 2001, Ponglowhapan et al. 2006). Por outro lado, o diluidor ACP-106c já demonstrou ser igualmente eficaz na conservação de sêmen canino refrigerado (Uchoa et al. 2012) sendo também utilizado para a conservação de espermatozoides do epidídimo de cutias (Silva et al. 2011). No entanto, esse diluidor à base de água de coco em pó ainda não foi testado para recuperação e conservação de espermatozoides epididimários de cão, podendo ser um diluidor alternativo e interessante para conservação de espermatozoides epididimários nessa espécie, como o foi para cutias.

Não há nenhum trabalho disponível com relação à refrigeração e recuperação espermática do CTE de cães utilizando diluidores à base de água de coco. Dependendo da forma como é conservado, podem ocorrer mudanças importantes na qualidade dos espermatozoides. Isto pode ser um entrave para a recuperação do material genético de animais que morreram inesperadamente e estão distantes do laboratório (Kabbi et al. 2003).

Assim, o estudo sobre a conservação do epidídimo canino sob refrigeração e posterior recuperação dos espermatozoides e diluição em ACP-106 é de grande importância, uma vez que abre a perspectiva de alternativas para a conservação do sêmen de reprodutores valiosos. Além do mais, o estudo de biotecnologias de sêmen canino serve como modelo a ser posteriormente testados para o sêmen de canídeos selvagens, tais como o lobo guará (*Chrysocyon brachyurus*) e o cachorro vinagre (*Spheotos venaticus*) de ocorrência no Brasil e ameaçados de extinção (Silva et al., 2001).

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade dos espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo e armazenados após a refrigeração usando o diluidor ACP-106c, pois acredita-se que o referido diluidor seja eficiente na recuperação dos espermatozoides epididimários após o CTE ter sido mantido refrigerado a 4°C.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais experimentais. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (protocolo número 11221529-7/39). Foram utilizados 60 cães machos sexualmente maduros, sem raça definida, com peso de 10-20 kg, oriundos do Centro de Controle de Zoonoses de Fortaleza, Ceará.

Eutanásia e orquiectomia bilateral. Os animais foram submetidos a jejum alimentar de 12 horas antecedendo a eutanásia. Para o procedimento de eutanásia, foi administrado 0,5 mg/Kg/IV de cloridrato de xilazina 10%, associado a 50 mg/Kg/IV de cloridrato de quetamina. Após 15 minutos da administração da anestesia, foi administrado cloreto de potássio 19,1% para indução de parada cardíaca na dose de 1 mL/Kg ou 2,56 mEq/kg. Em seguida, procedeu-se a remoção do CTE e o par contendo o CTE foi imerso em solução fisiológica 0,9% a 30°C e transportado em caixa térmica até o laboratório a 30°C em um tempo médio de 20 minutos.

Refrigeração do complexo testículo-epidídimo. Após serem transportados os pares contendo o CTE foram colocados em refrigerador a 4°C., divididos em grupos, sendo 15 pares destinados para cada grupo: (G0h) não foi refrigerado, sendo os demais refrigerados a 4° C por seis (G6h), doze (G12h) ou dezoito horas (G18h).

Recuperação dos espermatozoides do epidídimo. A recuperação dos espermatozoides da cauda do epidídimo foi realizada pela técnica de flutuação relatada por Yu & Leibo, (2002). O tecido conjuntivo que recobre o epidídimo foi removido e os contornos do ducto epididimário da cauda do epidídimo desfeitos. Cada ducto epididimário foi colocado em placa de petri individual previamente aquecida a 37°C. Em seguida, foram realizados cortes na região do ducto deferente e cauda epididimária, logo após foi adicionado 1,0 mL de diluente ACP-106c (ACP Biotecnologia®) ou 1,0 mL de diluente Tris (Sigma®), ambos diluentes pré-aquecidos a 37°C, deixando em repouso por 5 minutos para que os espermatozoides entrassem em contato com o diluente, em seguida foram centrifugados a 800g por 5 minutos para remoção dos resíduos celulares.

Avaliação dos espermatozoides epididimários. Os espermatozoides colhidos foram avaliados quanto à morfologia espermática, funcionalidade de membrana, motilidade total e progressiva, além da velocidade média na trajetória (VAP), velocidade curvilínea (VCL), velocidade linear (VSL), índice de progressão (STR) e de linearidade (LIN).

A morfologia espermática foi realizada utilizando 10µL da amostra em 150 µL do corante rosa de bengala, sendo realizado esfregaço úmido e avaliado através microscopia óptica no aumento de 1000x, contando-se 200 células que foram classificadas como normal ou anormal (Mota Filho et al. 2011).

A funcionalidade da membrana espermática foi avaliada por meio do teste hiposmótico (HOST) realizado imediatamente após a recuperação espermática, usando-se água destilada como solução hiposmótica. Uma alíquota da amostra foi diluída na proporção de 10µL da amostra para 90 µL de água destilada uma alíquota espermática foi colocada em uma lâmina de vidro, coberta com lamínula, sendo contadas 200 células com auxílio de microscópio ótico com aumento de 400x. Após este período, A membrana espermática foi considerada funcional quando os espermatozoides apresentavam sua cauda enrolada (Quintela et al. 2010).

Para a análise computadorizada utilizou-se um microscópio de contraste de fases acoplado a uma vídeo-câmera adaptada ao sistema *Sperm Class Analyser*® (SCA, Microptic S.L., versão 5.2.0). Os parâmetros mensurados na avaliação computadorizada das amostras foram: motilidade total, motilidade progressiva, VAP, VCL, VSL, STR e LIN (Mota Filho et al. 2011, Uchoa et al. 2012).

Análise estatística. Análises estatísticas dos dados referentes a parâmetros motilidade espermática (motilidade total, motilidade progressiva, VCL, VAP, LIN, STR, morfologia, e HOST) foram realizadas por ANOVA utilizando o procedimento GLM (General Linear Model) do programa SYSTAT versão 7.0, USA.

As comparações entre os diluidores e horas de conservação foram realizadas pelo teste de Turkey (teste de comparação aos pares). Antes de analisar os dados foram expressos em porcentagem (motilidade,

motilidade progressiva, morfologia e HOST) foi realizada uma transformação angular de porcentagens. Esta transformação permitiu em vez de utilizar a proporção encontrada, empregar o valor de ACS (SQR (MOTILIDADE/100)), ACS (SQR (MOTPROG/100)), ACS (SQR (MORFO/100)) e ACS (SQR (HOST/100)) expresso em graus, para expressão da distribuição normal dos dados.

RESULTADOS

Os diluidores ACP106c e Tris foram similares na conservação da morfologia espermática no decorrer de todo o experimento ($P>0,05$). No entanto, verificou-se que com 18 horas ocorreu um decréscimo significativo da morfologia espermática ($P<0,05$; Fig.1).

Não foram evidenciadas diferenças entre os diluidores com relação à resposta osmótica das células espermáticas ($P>0,05$), existindo, no entanto, um declínio significativo da função de membrana das células com 18 h ($P<0,05$; Fig.2).

A motilidade total manteve-se inalterada até 12 horas de refrigeração e declinou significativamente após 18 horas ($P<0,05$; Fig.3).

Os dados referentes à avaliação da motilidade progressiva estão expressos no Quadro 1. Não foram evidenciadas diferenças entre os dois diluidores no que se refere à conservação da motilidade espermática em nenhum dos momentos de avaliação ($P>0,05$). Porém foi observado um declínio deste parâmetro em ambos os grupos após 18 horas de refrigeração ($P<0,05$).

Os parâmetros da análise computadorizada, mais uma vez não diferiram entre os diluidores testados ($P>0,05$). Com relação aos tempos de refrigeração, também não foram observadas diferenças nas VCL, VSL, LIN e STR ($P>0,05$). No entanto, a VAP reduziu após 6 horas de refrigeração.

DISCUSSÃO

No presente trabalho, ambos os diluidores (ACP-106c ou Tris) foram eficientes para a recuperação de espermatozoides epididimário em cães segundo a técnica de Yu & Leibo (2002). O Tris já havia sido testado em cães para recuperação de espermatozoides epididimários com sucesso (Hori et al. 2005, Ponglowhapan et al. 2006, Martins et al. 2009). Porém o diluidor à base de água de coco nunca havia sido utilizado para esse fim em cães, apenas em cutias (Silva et al. 2011), e esses autores obtiveram melhores resultados com o ACP-109c quando comparado com o Tris.

Com base nos resultados do presente trabalho, observou-se que os diluidores ACP-106c e Tris tiveram melhores resultados quando comparados aos relatados por Ponglowhapan et al. (2006) e Melo et al. (2010) que utilizaram Tris e obtiveram 68% e 45% motilidade total, respectivamente. Já Yu & Leibo (2002) que utilizaram solução salina obtiveram 65% de motilidade total. Dessa maneira, o ACP-106c pode ser um diluidor alternativo passível de substituir o Tris.

Os resultados de morfologia espermática obtidos no presente trabalho foram semelhantes aos descritos por Yu & Leibo (2002) em torno de 80% de células normais. A porcentagem de alterações observadas com o ACP e Tris foram praticamente iguais, sendo observado uma redução com o decorrer do tempo. Apesar de às 18h ter apresentado o menor percentual de células normais, esses resultados encontram-se de acordo com a faixa normal descrita no manual do Colégio Brasileiro Reprodução Animal (1998).

Os valores encontrados no teste hiposmótico foram semelhantes à motilidade total o que corrobora com os relatos de Rota et al. (2005) e Silva et al. (2006). A avaliação da integridade de membrana através do teste hiposmótico é simples, sendo considerado como um indicativo da fertilidade em algumas espécies como bovinos (Revell & Mrode, 1994), javali (Perez-Llano et al. 2001). Nos cães, a correlação da resposta osmótica com a fertilidade *in vivo* ou *in vitro* ainda não foi estabelecida (Peña-Martinez, 2004).

O teste hiposmótico utilizando a água destilada (Quintela et al. 2010) é um método eficiente para analisar a integridade funcional da membrana do espermatozoide epididimário fresco (Hishinuma & Sekine, 2003).

Os epidídimos podem ser transportados refrigerados para os centros especializados em recuperação, refrigeração e congelação de amostras do epidídimo ou ainda processado no próprio local por um técnico especializado (Bruemmer et al. 2002). Amostras oriundas de epidídimos refrigerados a 5 °C durante 24 h podem ser aproveitadas para uma posterior congelação em diferentes espécies (Marks et al. 1994, Blash et al. 2002, Soler et al. 2003).

Após a morte do garanhão, os espermatozoides permanecem viáveis no epidídimo até que a decomposição tecidual afete sua viabilidade (Bruemmer et al. 2002, Muradás et al. 2006). Se os epidídimos forem armazenados a 5 °C por 24, 48 72 e 96 horas, a viabilidade espermática pode ser mantida por mais tempo (Bruemmer et al. 2002, James et al. 2002).

Com relação à motilidade espermática total e progressiva, os resultados deste estudo mostram que nos cães pode ocorrer uma redução desse parâmetro a baixas temperaturas, mesmo os espermatozoides estando em um ambiente protegido, dentro do epidídimo, até a sua posterior recuperação (Yu & Leibo, 2002). O espermatozoide do garanhão (Amann et al. 1999), gato (Parks, 1997) e cão (Province et al., 1984; Watson, 1995) é pouco sensível ao choque térmico.

Acredita-se então que a redução da motilidade total e progressiva com 18 horas seja em decorrência do tempo de refrigeração do CTE. Os dados referentes à análise computadorizada apresentaram valores semelhantes aos descritos por (Martins et al. 2009), exceto a motilidade total que foi de 44%. No entanto, esses valores encontram-se dentro de uma faixa aceitável para posterior inseminação artificial em cadelas. Outro parâmetro que vale destacar é a VAP, pois mesmo apresentando diferenças entre as horas, ainda apresentou valores em torno de 70%. A VAP é conhecida como um parâmetro signficante da fertilidade *in vitro* (Silva et al. 2006, Versteegen et al. 2002).

CONCLUSÕES

O CTE canino pode ser conservado até 18 horas sob-refrigeração a 4°C , preservando a qualidade espermática pós coleta e diluição. Contudo, visando utilização em inseminação artificial, a conservação até 12 horas apresenta qualidade seminal aceitável.

O diluidor ACP-106c foi eficiente para preservação *in vitro* dos espermatozoides canino pós-recuperação a 37 °C, permitindo uma boa avaliação dos parâmetros de motilidade espermática.

Contudo, testes *in vivo*, via inseminação são necessários para confirmação dos resultados obtidos *in vitro*, verificando-se a preservação do poder fecundante dos espermatozoides epididimários.

Agradecimentos.- Ao Centro de Controle de Zoonoses por ter-nos permitido utilizar os animais de seu canil. Esse trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional e Tecnológico (CNPq) e Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) por meio da concessão de bolsa ACMF e LDMS. As agências financiadoras não tiveram participação na elaboração do desenho experimental, coleta de dados análises, decisão de publicar ou preparação do manuscrito.

Declaração de Conflito de Interesses.- Os autores declaram nenhum conflito de interesse no que diz respeito à pesquisa, autoria, e/ou publicação desse artigo.

REFERÊNCIAS

- Amann R.P., Shabanowitz R.B., Huszar G. & Broder S.J. 1999. In vitro sperm-binding assay to distinguish differences in populations of human sperm or damage to sperm resulting from cryopreservation. J. Androl. 20:648-654.
- Blash S., Melican D. & Gavin W. 2002. Cryopreservation of epididymal sperm obtained at necropsy from goats. Theriogenology 54:899-905.
- Bruemmer J.E., Reger H., Zibinski G. & Squires E.L. 2002. Effect of storage at 5°C on the motility and cryopreservation of stallion epididymal spermatozoa. Theriogenology 58:405-407.
- CBRA 1998. Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal. 2ª ed. CBRA, Belo Horizonte. 49p.

- Contri A., Gloria A., Robbe D., Amicis I.D. & Carluccio A. 2011. Characteristics of donkey spermatozoa along the length of the epididymis. *Theriogenology* 77:166-173.
- Goodrowe K.L. & Hay M. 1993. Characteristics and zona binding ability of fresh and cooled domestic cat epididymal spermatozoa. *Theriogenology* 40:967-975.
- Heise A., Kähn W., Volkmann D.H., Thompson P.N. & Gerber D. 2010. Influence of seminal plasma on fertility of fresh and frozen-thawed stallion epididymal spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 118:48-53.
- Hewitt D.A., Leahy R., Sheldon I.M. & England G.C. 2001. Cryopreservation of epididymal dog sperm. *Anim. Reprod. Sci.* 67:101-111.
- Hishinuma M. & Sekine J. 2003. Evaluation of membrane integrity of canine epididymal spermatozoa by short hypoosmotic swelling test with ultrapure water. *J. Vet. Med. Sci.* 65:817-820.
- Hori T., Hagiuda K., Kawakami E. & Tsutsui T. 2005. Unilateral intrauterine insemination with prostatic fluid-sensitized frozen caudal epididymal sperm in beagle dogs. *Theriogenology* 63:1573-1583.
- James A.N., Green H., Hoffman S., Landry A.M., Paccamonti D. & Godke R.A. 2002. Preservation of equine sperm stored in the epididymis at 4 °C for 24, 48, 72 and 96 hours. *Theriogenology* 58:401-404.
- Kaabi, M., Paz, P., Alvarez M., Anel E., Boixo J.C., Rouissi H., Herraes P. & Anel L. 2003. Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. *Theriogenology* 60:1249-1259.
- Lone F.A., Islam R., Khan M.Z. & Sofi K.A. 2011. Effect of transportation temperature on the quality of cauda epididymal spermatozoa of ram. *Anim. Reprod. Sci.* 123:54-59.
- Luvoni G.C., Ruggiero C., Marinoni G. & Kalchschmidt E. 2003. Effect of taurine containing diluent for cryopreservation of domestic cat epididymal sperm. *Theriogenology* 57:466.
- Marks S.L., Dupuis J., Mickelson W.D., Memon M.A., & Platz C.C.J.R. 1994. Conception by use of postmortem epididymal semen extraction in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 204:1639-1640.
- Martins C.F., Driessen K., Melo Costa P., Carvalho-Neto J.O., Sousa R.V., Rumpf R. & Dode M.N. 2009. Recovery, cryopreservation and fertilization potential of bovine spermatozoa obtained from epididymides stored at 5 °C by different periods of time. *Anim. Reprod. Sci.* 116:50-57.
- Melo J.V.S., Oliveira G.R., Valle M.A., Rachid F.C.G., Soares J.J.R.T. & Matos M.I.V. 2010. Efeito da centrifugação e do líquido prostático homólogo na criopreservação de espermatozoides epididimários caninos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 62:603-608.
- Mota Filho A.C., Teles C.H.A., Jucá R.P., Cardoso J.F.S., Uchoa D.C., Campello C.C., Silva A.R. & Silva L.D.M. 2011. Dimethylformamide as a cryoprotectant for canine semen diluted and frozen in ACP-106C. *Theriogenology* 76:1367-1372.
- Muradás P.R., Weiss R.R., Kozicki L.E., Granemann L.C., Santos I.W. & Pimpão C.T. 2006. Alguns parâmetros de viabilidade de espermatozoides eqüinos colhidos por vagina artificial e por lavagem da cauda do epidídimo. *Archs Vet. Sci.* 11:69-74.
- Parks J.E. 1997. Hypothermia and mammalian gametes. In: Karow AM, Critser JK, editors. *Reproductive tissue banking*. Academic Press, San Diego. 229-61.
- Peña-Martinez I. 2004. Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Anim. Reprod. Sci.* 82/83:209-224.
- Perez-Llano B., Lorenzo J.L., Yenes P., Trejo A. & Garcia-Casado P. 2001. A short hypoosmotic swelling test for the prediction of boar sperm fertility. *Theriogenology* 56:387-398.
- Ponglowhapan S. & Chatdarong K. 2006. Effects of Equex STM Paste on the quality of frozen-thawed epididymal dog spermatozoa. *Theriogenology* 69:66-72.
- Province C.A., Amann R.P., Pickett B.W. & Squires E.L. 1984. Extenders for preservation of canine and equine spermatozoa at 5 °C. *Theriogenology* 22:409-15.
- Quintela A.T., Oliveira I.R.S., Souza A.O., Gusmão A.L. & Silva A.R. 2010. Water-induced hypo-osmotic test for the evaluation of canine sperm membrane integrity. *Anim. Reprod.* 7:70-74.
- Revel S.G. & Mrode R.A. 1994. An osmotic resistance test for bovine semen. *Anim. Reprod. Sci.* 36:77-86.
- Rota A., Martine M., Milani C. & Romagnoli S. 2005. Evaluation of dog semen quality after slow (biological freezer) or rapid (nitrogen vapours) freezing. *Reprod. Nutr. Dev.* 45:29-37.
- Schäfer S. & Holzman A. 2000. The use of transmigration and Spermac® stain to evaluate epididymal cat spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 59:201-211.
- Silva A.R., Cardoso R.S.C. & Silva L.D.M. 2006. 2001. Criopreservação do sêmen canino: revisão. *Ci. Anim.* 11:119-129.

- Silva A.R., Cardoso R.S.C. & Silva L.D.M. 2006. Influence of temperature during glycerol addition and post thaw dilution on the quality of canine frozen semen. *Reprod. Domest. Anim.* 41:74-78.
- Silva M.A., Peixoto G.C.X., Santos E.A.A., Castelo T.S., Oliveira M.F. & Silva A.R. 2011. Recovery and cryopreservation of epididymal sperm from agouti (*Dasiprocta aguti*) using powdered coconut water (ACP-109c) and Tris extenders. *Theriogenology* 76:1084-1089.
- Soler A.J., Garcia A.J., Santos M.R.F., Estes M.C. & Garde A.J.J. 2003. Effects of thawing procedure on post-thawed *in vitro* viability and *in vivo* fertility of red deer epididymal spermatozoa cryopreserved at -196°C. *J. Androl.* 24:1-19.
- Tamayo-Canula J., Alvarez M.E., López-Urueña A., Nicolasa M., Martinez-Pastora F., Anela E., Anela L. & Paz P. 2011. Undiluted or extended storage of ram epididymal spermatozoa as alternatives to refrigerating the whole epididymes. *Anim. Reprod. Sci.* 126:76-82.
- Tsutsui T., Wada M., Anzai M. & Hore T. 2003. Artificial insemination with frozen epididymal sperm in cats. *J. Vet. Med. Sci.* 65:397-399.
- Uchoa D.C., Silva T.F.P., Cardoso J.F.S., Mota Filho A.C., Jucá R.P., Silva A.R. & Silva L.D.M. 2012. Favoring the birth of female puppies after artificial insemination using chilled semen diluted with powdered coconut water (ACP-106c). *Theriogenology* 77:1959-1963.
- Verstegen J., Iguer-Ouada M. & Onclin K. 2002. Computer assisted analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 57:149-179.
- Watson P.F. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.* 7:871-891;
- Yu I. & Leibo S. 2002. Recovery of motile, membrane-intact spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4°C. *Theriogenology* 57:1179-1190.

Legenda de Figuras

Fig.1. Morfologia espermática (média $\pm$ DP) em relação aos períodos de avaliação utilizando (A) o diluidor ACP-106c e (B) Tris ($P>0,05$).

Fig.2. Percentual (média $\pm$ DP) de espermatozoides com cauda enrolada (funcionalidade espermática) em relação aos períodos de avaliação utilizando o diluidor ACP-106c e Tris ($P>0,05$).

Fig.3. Motilidade total (média $\pm$ DP) em relação aos períodos de avaliação utilizando o diluidor ACP-106c e Tris ($P>0,05$).

Quadro 1. Percentual (média $\pm$ DP) de motilidade progressiva por meio da análise computadorizada, utilizando os diluidores ACP-106c e Tris para a recuperação de espermatozoides epididimários após serem mantidos refrigerados por 0, 6, 12 ou 18h

Motilidade progressiva (%)	ACP-106c	Tris
0h	34,5 $\pm$ 12,0 ^{aA}	28,0 $\pm$ 9,4 ^{aA}
6h	45,0 $\pm$ 30,3 ^{aA}	40,4 $\pm$ 16,2 ^{aA}
12h	39,1 $\pm$ 18,8 ^{aA}	32,1 $\pm$ 13,9 ^{aA}
18h	25,6 $\pm$ 13,9 ^{bA}	23,5 $\pm$ 8,5 ^{bA}

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam que houve diferença estatística entre as horas ($P<0,05$).

Letras maiúsculas iguais na mesma linha indicam que não houve diferença estatística entre os diluidores ($P>0,05$).

Quadro 2. VAP, VCL, VSL, LIN E STR (média $\pm$ desvio padrão), utilizando os diluidores ACP-106c e Tris para a recuperação de espermatozoides epididimários após serem mantidos refrigerados por 0, 6, 12 ou 18h

Hora	Diluidor	Parâmetros				
		VAP	VCL	VSL	LIN	STR
0h	ACP-106c	79,9 $\pm$ 7,1 ^a	95,4 $\pm$ 16,1 ^a	73,6 $\pm$ 9,2 ^a	57,0 $\pm$ 12,3 ^a	71,1 $\pm$ 10,8 ^a
	Tris	77,4 $\pm$ 8,3 ^a	84,1 $\pm$ 12,9 ^a	66,5 $\pm$ 11,2 ^a	53,9 $\pm$ 13,3 ^a	63,5 $\pm$ 13,4 ^a
6h	ACP-106c	64,8 $\pm$ 21,2 ^b	93,5 $\pm$ 21,7 ^a	57,4 $\pm$ 29,3 ^a	60,9 $\pm$ 15,3 ^a	86,9 $\pm$ 9,5 ^a
	Tris	60,8 $\pm$ 18,6 ^b	88,6 $\pm$ 31,6 ^a	55,0 $\pm$ 20,7 ^a	54,4 $\pm$ 12,3 ^a	83,3 $\pm$ 9,4 ^a
12h	ACP-106c	72,2 $\pm$ 12,6 ^{ab}	100,8 $\pm$ 14,5 ^a	61,3 $\pm$ 18,4 ^a	58,1 $\pm$ 12,7 ^a	81,2 $\pm$ 11,6 ^a
	Tris	68,4 $\pm$ 15,0 ^{ab}	98,3 $\pm$ 19,3 ^a	57,3 $\pm$ 18,8 ^a	55,8 $\pm$ 12,5 ^a	80,1 $\pm$ 11,2 ^a
18h	ACP-106c	66,0 $\pm$ 20,6 ^b	88,1 $\pm$ 22,1 ^a	59,8 $\pm$ 22,5 ^a	65,0 $\pm$ 12,5 ^a	88,6 $\pm$ 6,9 ^a
	Tris	66,1 $\pm$ 22,4 ^b	89,4 $\pm$ 20,9 ^a	58,2 $\pm$ 22,8 ^a	62,2 $\pm$ 11,2 ^a	88,7 $\pm$ 6,3 ^a

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna (comparação entre as horas dentro de um mesmo diluidor) indicam que houve diferença estatística ($P < 0,05$).

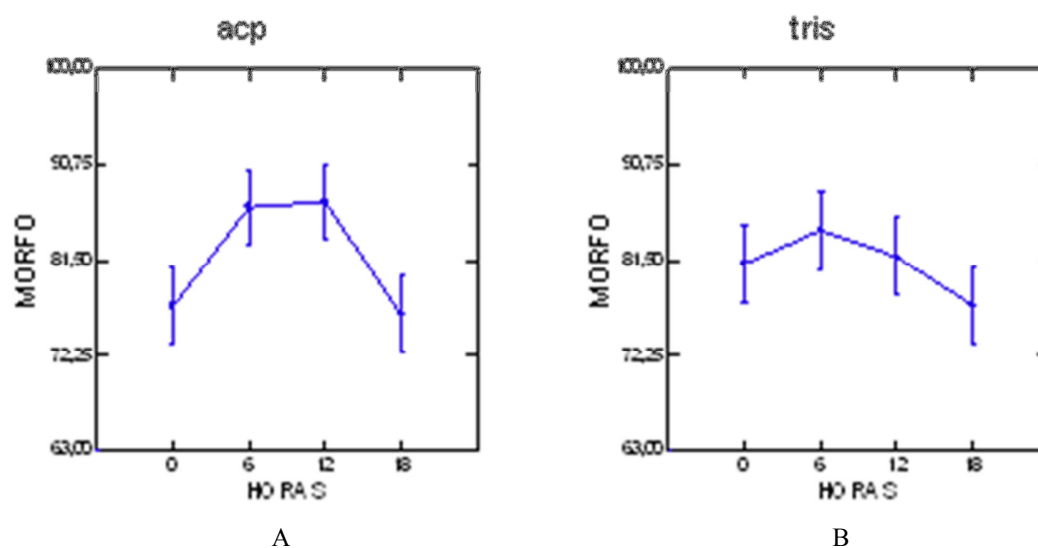
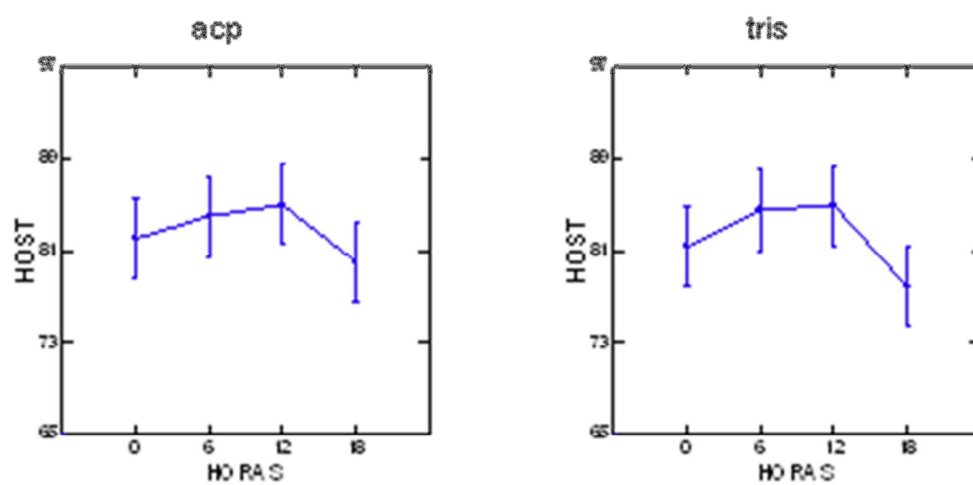


Figura 1.



A

B

Figura 2

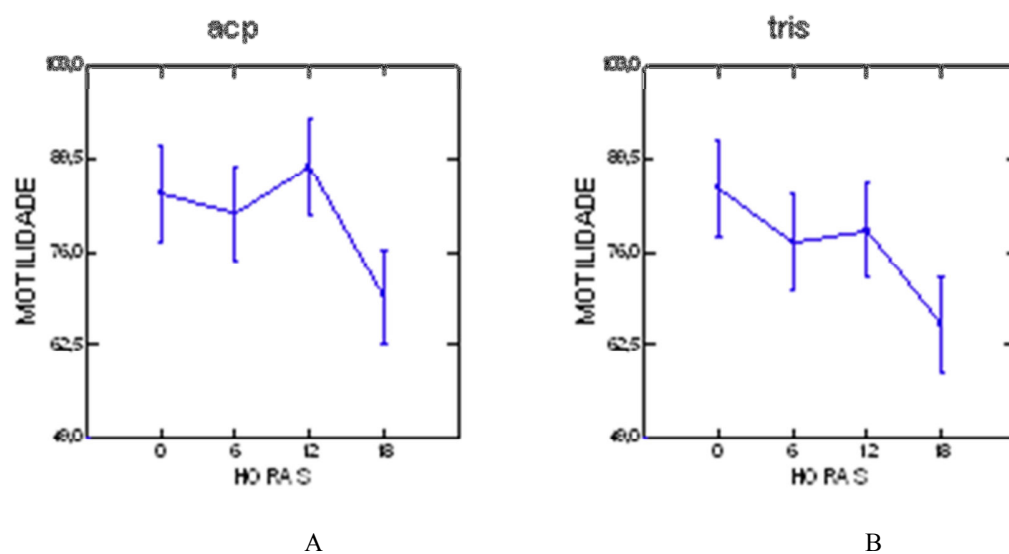


Figura 3

7. CAPÍTULO 02

CRYOPRESERVATION OF CANINE EPIDIDYMAL SPERM USING ACP-106C AND TRIS

Periódico :Publicado no periodico Cryobiology (B1) fator de impacto: 2,137 DOI:
10.1016/j.cryobiol.2014.04.013

RESUMO

O objetivo do trabalho foi criopreservar espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo imediatamente após orquiectomia e após 12 horas de armazenamento a 4°C, utilizando os diluidores ACP-106c e TRIS. Foram utilizados 60 cães machos adultos, com peso de 10-20 kg. Removeu-se o complexo testículo-epidídimo (CTE) que foi imerso em solução fisiológica 0,9% e transportado em caixa térmica ao laboratório a 30°C. Os 60 CTE foram divididos em 4 grupos de acordo com o tempo de refrigeração (0h ou 12h) a 4°C e de acordo com o diluidor (Acp-106c ou TRIS) empregado para a recuperação espermática, constituindo os 4 grupos experimentais: G0h-ACP, G12h-ACP, G0h-TRIS e G12h-TRIS). A recuperação dos espermatozoides da cauda do epidídimo foi realizada pela técnica de fluxo retrogrado. Em seguida, o material obtido foi centrifugado a 800g/5 minutos para remoção dos resíduos celulares e submetidos à criopreservação. Para cada epidídimo foi adicionado 1,0 mL de um dos dois diluidores, pré-aquecidos a 37°C por 5 minutos, uma semana após foram descongelados a 37°C/1 min e submetidos à avaliação de morfologia, funcionalidade e motilidade espermática total e progressiva, além de parâmetros obtidos pelo CASA. Os dados foram submetidos à MANOVA ($P < 0,05$). Os valores de motilidade total nos grupos G0h e G12h, para o ACP-106c foram, $52,17 \pm 1,78$; $49,8 \pm 1,93$ e Tris $50,7 \pm 2,06$ e $43,90 \pm 2,51$, respectivamente. Um decréscimo na motilidade espermática total foi observado após 18 horas de refrigeração do CTE em ambos os diluidores ($P < 0,05$). O diluidor ACP-106c, pode ser utilizado para criopreservação de espermatozoides epididimários caninos, devendo realizar o procedimento de congelamento, imediatamente após recuperação espermática.

Palavras chaves: Criopreservação, epidídimo, cão.



Contents lists available at ScienceDirect

Cryobiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ycryoCryopreservation of canine epididymal sperm using ACP-106c and TRIS[☆]

Antônio Cavalcante Mota Filho^a, Herlon Victor Rodrigues Silva^a, Thalles Gothardo Pereira Nunes^b,
Mírley Barbosa de Souza^a, Luana Azevedo de Freitas^a, Ailton Alencar de Araújo^c,
Lúcia Daniel Machado da Silva^{a,*}

^a Laboratory of Carnivore Reproduction, School of Veterinary Medicine, State University of Ceará, Av. 1700, CEP Fortaleza, CE, Brazil

^b Laboratory of Swine Semen Technology, School of Veterinary Medicine, State University of Ceará, Av. 1700, CEP Fortaleza, CE, Brazil

^c Faculdade de Zootecnia, Federal University of Ceará, Campus do Pici, Av. Mister Hull, 2977, CEP 60021-970 Fortaleza, CE, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 March 2014

Accepted 24 April 2014

Available online 10 May 2014

Keywords:

Cryopreservation

Epididymis

Dog

Sperm

ABSTRACT

The objective was to cryopreserve sperm recovered from the canine epididymal cauda immediately after an orchiectomy. The sperm was stored for 12 h at 4 °C using ACP-106c and TRIS as extenders. Sixty adult male dogs were used. The testis–epididymis complex (TEC) was removed, immersed in 0.9% saline and transported to the laboratory. The 60 TEC were divided into groups according to the 4 °C cooling time (0 h or 12 h) and according to the extender used for sperm recovery (ACP-106c or TRIS), forming 4 experimental groups: G0h-ACP, G12h-ACP, G0h-TRIS and G12h-TRIS. The sperm were recovered from the epididymal cauda using the retrograde flow technique. Next, 1.0 mL of ACP-106c or 1.0 mL of TRIS (preheated to 37 °C for 5 min) was added to the sperm of each epididymis. One week later, the sperm was thawed at 37 °C for 1 min, and its morphology, functionality and total and progressive sperm motilities were analyzed. Other parameters were obtained by Computer Assisted Semen Analysis (CASA). The data were submitted to multivariate analysis of variance (MANOVA) ($P < 0.05$). The total motility values were 52.17 ± 1.78 and 49.8 ± 1.93 for groups G0h-ACP and G12h-ACP and 50.7 ± 2.06 and 43.90 ± 2.51 for groups G0h-TRIS and G12h-TRIS, respectively. A decrease in total sperm motility was observed after 12 h of cooling for both extenders ($P < 0.05$). ACP-106c can be used as an extender for freezing canine epididymal sperm, and the freezing procedure must be performed immediately after sperm recovery.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

The cryopreservation of epididymal sperm is an important biotechnique that can be used in assisted reproduction and animal conservation. Its use in assisted reproductive technologies may contribute significantly to the preservation of genetic material and may help create progeny of valuable males who die unexpectedly or undergo orchiectomy for medical reasons [33]. The cryopreservation of epididymal sperm has been studied for several

different species: humans [19], wild boars [10], boars [11], cats [3], gazelles [26] and bulls [16]. Furthermore, the cryopreservation of epididymal sperm could be a helpful resource to rescue the germplasms of dead animals and use them in the preservation of endangered species [35].

However, choosing an appropriate extender to preserve the characteristics and quality of the sperm cells is essential for successful cryopreservation [14]. Studies have already demonstrated the effectiveness of TRIS as an extender in the conservation of canine epididymal sperm [7,14,22,23]. Conversely, a powdered coconut water extender specific for dogs (ACP-106c) was effective in preserving dog semen recovered from ejaculate [5,18]. The ACP-106c extender has not been tested in the preservation of canine epididymal sperm, but it may be an interesting alternative given that it was effective at preserving epididymal sperm in agoutis [30].

However, under field conditions, it is not always possible to process epididymal sperm due to a lack of technical staff and equipment. Thus, refrigerated transport of the testis–epididymis complex (TEC) to the laboratory aims to reduce tissue cell death

[☆] Statement of funding: Financial support for this study was obtained from Brazilian funding agencies: Coordenação de Apoio a Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) through individual research grants to Lúcia Daniel Machado da Silva and fellowship to Antônio Cavalcante Mota Filho, Herlon Victor Rodrigues Silva, Luana Azevedo de Freitas and Mírley Barbosa da Souza. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

* Corresponding author. Fax: +55 85 3101 9840.

E-mail address: lucia.daniel.machado@hotmail.com (L.D.M. da Silva).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.04.013>

0011-2240/© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

and maintain the viability of these sperm inside the epididymis [13]. Conditioning the TEC for 12 h at 4 °C may be sufficient to travel to specialized centers, where processing and cryopreservation can occur.

Thus, the present study aimed to cryopreserve canine sperm recovered from the epididymal cauda either immediately after orchietomy or after 12 h of storage at 4 °C of TEC using the extenders ACP-106c and TRIS.

Materials and methods

Experimental animals

The study was approved by the Animal Research Ethics Committee of the State University of Ceará (protocol number 11221529-7/39). In total, 60 mixed breed sexually mature male dogs weighing from 10 to 20 kg were used. The animals came from the Center for Zoonosis Control in Fortaleza, Ceará (CE), Brazil.

Cooling of the TEC

The testis–epididymis complex (TEC) were obtained according to a previously described methodology [17], and then they were transported in insulated containers under temperature control at 30 °C to the laboratory.

Recovery of epididymal sperm

The sperm from the epididymal cauda were recovered using the retrograde flow technique previously reported [30]. The connective tissue that covers the epididymis was removed, and the contours of the epididymal duct of the epididymal cauda were ruptured. Then, the epididymis was washed externally with 0.9% saline to remove the blood and connective tissue that covers the epididymal cauda. This procedure was repeated ten times each for the three containers holding 50 mL of 0.9% saline solution. To wash the two ends of the segment, ligatures were placed to prevent sperm leakage. Using a syringe with a 25G needle, 1.0 mL of ACP-106c (ACP Biotechnology®) (ACP-Biotecnologia, Fortaleza, Brazil) or TRIS (Sigma®) was slowly added to the container. Both extenders had been preheated to 37 °C and were left to rest in the containers for 5 min to allow the sperm to be in contact with the extender.

Then, the extender solutions were centrifuged at 800g for 5 min to remove any cell debris.

The 60 TEC pairs were divided into four equal groups, as shown in Fig. 1. Group division scheme: G0h-ACP (sperm recovered from the epididymis immediately after orchietomy, using ACP-106c as the extender), G0h-TRIS (sperm recovered from the epididymis immediately after orchietomy, using TRIS as the extender), G12h-ACP (sperm recovered from the epididymis 12 h after cooling at 4 °C, using ACP-106c as the extender), G12h-TRIS (sperm recovered from the epididymis 12 h after cooling at 4 °C, using TRIS as the extender).

Cryopreservation of the epididymal sperm

After centrifugation, the epididymal sperm samples were submitted to cryopreservation with TRIS or ACP-106c. The samples were diluted using simple dilution at room temperature (30 °C). The extender used in each ACP-106c sample contained 6% glycerol and 10% egg yolk, and that used in each TRIS sample contained 6% glycerol and 20% egg yolk. Then, the samples were stored in glass tubes, placed in a container with water and packed in an insulated container with recyclable ice (at 15 °C) for 40 min. Subsequently, they were transferred to a refrigerator until they reached 4 °C (approximately 30 min). After this period, the samples were placed into 0.25 mL straws (IMV Technologies; L'Aigle, France) and subjected to the freezing ramp before being stored in liquid nitrogen. After one week, the straws were thawed in a water bath at 37 °C for 1 min and evaluated [28].

Evaluation of the epididymal sperm

The sperm from the 0 h groups were evaluated immediately after TEC arrived at the laboratory, and those from the other groups were assessed 12 h after TEC arrived at the laboratory. All samples were analyzed for sperm morphology, membrane functionality (via the hyposmotic swelling test – HOST), total and progressive motilities, average path velocity (VAP), curvilinear velocity (VCL), straight-line velocity (VSL), straightness index (STR), linearity index (LIN), beat cross frequency (BCF) and amplitude of lateral head displacement (AIH).

The sperm morphology was analyzed using 10 µL of the sample in 150 µL of rose bengal stain. A wet smear was obtained and

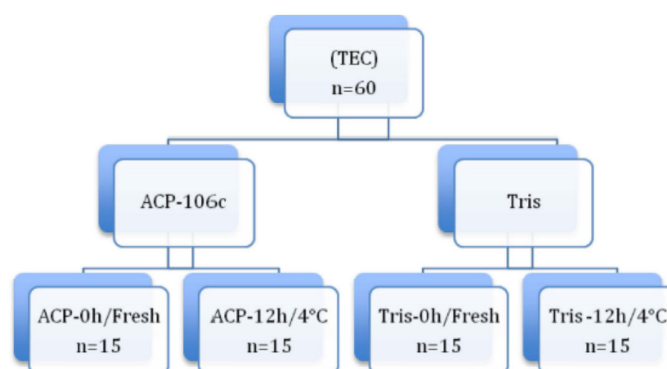


Fig. 1. Group division scheme: G0h-ACP (sperm recovered from the epididymis immediately after orchietomy, using ACP-106c as the extender), G0h-TRIS (sperm recovered from the epididymis immediately after orchietomy, using TRIS as the extender), G12h-ACP (sperm recovered from the epididymis 12 h after cooling at 4 °C, using ACP-106c as the extender), G12h-TRIS (sperm recovered from the epididymis 12 h after cooling at 4 °C, using TRIS as the extender).

evaluated by light microscopy at 1000 $\times$ magnification, in which 200 cells were counted and classified as normal or abnormal [18].

The functionality of the sperm membrane was evaluated by the HOST, which was performed immediately after sperm recovery using distilled water as a hypotonic solution. One aliquot of the sample was diluted in a ratio of 10 μ L of sample to 90 μ L of distilled water. One sperm aliquot was mounted on a glass slide and covered with a coverslip, and then 200 cells were counted and examined with the aid of a light microscope at 400 $\times$ of magnification. The sperm membrane was considered functional when the sperm had a curled tail [24].

For the computer-assisted analysis, a phase contrast microscope was coupled to a video camera adapted to the *Sperm Class Analyser*[®] system (SCA, Microptic S.L., version 5.2.0). The parameters measured in the computer evaluation of the samples were the total motility, progressive motility, VAP, VCL, VSL, STR, LIN, BCF and ALH [18,32].

Statistical analysis

Data were expressed as mean and standard error. The means were compared between the two extenders (ACP-106c and TRIS) and between the two storage times (0 and 12 h). The parameter comparisons between the extenders at each time and between the times for each extender were performed by the MANOVA procedure of the SYSTAT program, version 13.0, USA.

Results

Motility and vigor of fresh epididymal sperm recovered with ACP-106c were 70.33 ± 10.43 and 3.66 ± 0.58 , respectively. Motility and vigor of fresh epididymal sperm recovered with TRIS were 68.33 ± 11.59 and 3.46 ± 0.61 , respectively.

Comparisons between extenders (ACP-106c $\times$ TRIS)

The total motility, progressive motility, VCL, VAP, LIN, BCF and HOST parameters did not differ between those samples stored with ACP-106c and those stored with TRIS at either of the times evaluated. The VSL, STR and morphology parameters were significantly superior in ACP-106c, whereas ALH was significantly inferior, when compared to TRIS at both evaluation times (Table 1).

Comparisons between times (0 h $\times$ 12 h)

The progressive motility, VCL, BCF, ALH and HOST parameters did not differ between the evaluation times for either extender.

The total motility, VSL, VAP, STR and morphology parameters were significantly superior at 0 h when compared to 12 h for both extenders, whereas the LIN was significantly inferior at 0 h when compared to 12 h for both extenders (Table 1).

Discussion

In the present study, the retrograde flow technique described by Silva et al. [30] was used to recover epididymal sperm. This technique was satisfactory because it allowed sperm to be obtained with little cell debris. Another technique described by Silva et al. [28] was used to freeze the epididymal sperm.

The results of the total and progressive sperm motility analysis show that epididymal sperm can be cryopreserved with ACP-106c and TRIS. Both extenders showed better results than did previous studies using TRIS [9,22,23,15].

TRIS had previously been tested for canine epididymal sperm cryopreservation, presenting a total motility around (33%) [23]. Our results obtained immediately after thawing presented a better total motility. Concerning ACP-106c, however, this extender had never been used before in canine epididymal sperm, only in agoutis [30]. In that work with agoutis, the authors obtained an average total motility of 26% using ACP-106c and only 9% using TRIS.

The combination of ACP-106c, 10% egg yolk and 6% glycerol was based on results described *in vitro* [2,4]. The satisfactory cryopreservation results of ACP-106c shown in the present study may be due to the composition of ACP-106c, which includes carbohydrates (fructose and glucose), minerals, vitamins, proteins, amino acids, dietary fibers, small amounts (<1%) of fatty acids and growth factors (phytohormones) [12]. These elements help to maintain the sperm cells.

CASA systems can be very useful for detecting changes in sperm movement, particularly for comparing the results obtained with different extenders and for improving the sperm evaluation after dog semen cryopreservation [27,34].

In addition, CASA systems can assess capacitation and detect sperm hyperactivation, a process that is necessary for successful penetration in the zona pellucida [27,34].

When trying to correlate CASA parameters with the fertilization rate, it was found that the values for VAP, VSL and VCL were significantly higher in samples that produce more than 50% of fertilized oocytes than in those where the rate of oocyte fertilization is less than 50% [34].

According to the CASA results, the VSL, STR and ALH parameters of ACP-106c-treated sperm were superior to the TRIS parameters. The STR parameter is associated with fertility [8,31], but the threshold at which this parameter may influence the fertility of

Table 1

The parameters of epididymal sperm (mean $\pm$ SD) assessed by CASA as well as sperm morphology and hypotonic tests. The sperm were cryopreserved using either ACP-106c or TRIS as the extender at two different cryopreservation times: immediately after sperm recovery (G0h) or after 12 h of storage (G12h). PM = progressive motility.

Parameters	0 h		12 h	
	ACP-106c	TRIS	ACP-106c	TRIS
Total motility	52.17 ± 1.78^{aA}	50.7 ± 2.06^{aA}	49.8 ± 1.93^{aB}	43.90 ± 2.51^{aB}
PM	20.73 ± 0.95^{aA}	17.54 ± 0.26^{aA}	17.06 ± 0.66^{aA}	15.07 ± 0.64^{aA}
VCL	88.78 ± 4.15^{aA}	88.82 ± 4.32^{aA}	85.03 ± 4.65^{aA}	84.43 ± 4.00^{aA}
VSL	74.84 ± 2.06^{aA}	70.26 ± 2.56^{bA}	69.64 ± 3.10^{bB}	60.11 ± 3.49^{bB}
VAP	80.34 ± 2.06^{aA}	78.76 ± 2.48^{aA}	75.50 ± 2.70^{bB}	70.10 ± 2.64^{bB}
LIN	65.19 ± 3.26^{aA}	62.55 ± 3.01^{aA}	56.58 ± 3.05^{bB}	55.54 ± 3.82^{bB}
STR	84.35 ± 1.03^{aA}	80.38 ± 1.47^{bA}	81.16 ± 1.16^{aB}	75.21 ± 1.24^{bB}
BCF	9.46 ± 0.36^{aA}	9.06 ± 0.30^{aA}	8.68 ± 0.26^{aA}	8.68 ± 0.24^{aA}
ALH	3.01 ± 0.11^{aA}	3.84 ± 0.18^{bA}	3.05 ± 0.12^{aA}	3.72 ± 0.19^{bA}
Morphology	84.1 ± 1.40^{aA}	79.9 ± 1.66^{bA}	80.4 ± 1.29^{aB}	71.9 ± 1.15^{bB}
HOST	78.80 ± 0.36^{aA}	75.40 ± 1.23^{aA}	75.80 ± 2.86^{aA}	70.53 ± 0.90^{aA}

Different lowercase letters in the same line indicate a significant difference between the extenders ($P < 0.05$).

Different uppercase letters in the same line indicate a significant difference between the times ($P < 0.05$).

canine sperm is still unknown. Silva et al. [29] observed a significant relationship between VAP, VSL and BCF and the *in vitro* interactions between frozen or thawed canine sperm and homologous oocytes, a result that emphasizes the use of CASA as an auxiliary tool for canine semen evaluation.

Another parameter worth examining is the VAP because while it decreased after 12 h, it still showed values of approximately 70%. The VAP is also a significant indicator of *in vitro* fertility [29,34]. This result shows that epididymal sperm may have a fertilizing capacity even after being cooled for 12 h, frozen and then thawed.

The significant increases in VCL and ALH are associated with a decrease in the LIN and are considered an indication of hyperactivation [27,34]. In the present study, this behavior was not observed after 12 h of cooling, which indicates that the processing of sperm did not induce sperm hyperactivation. This phenomenon should not occur early *in vitro*, so this is a positive result. According to Schäfer-Somi et al. [27], semen extenders may influence the linearity of the sperm. However, that effect was not observed in the present study. The decrease observed in the LIN after 12 h, on the other hand, is an expected phenomenon.

According to Arruda [1], the greater the numerical value obtained for parameters VAP, VSL, VCL, BCF, STR and LIN, the better the sperm quality; in contrast, the greater the ALH numerical value obtained, the worse the sperm quality.

The results of the sperm morphology analysis obtained in the present study were better than those described by Ponglowhapan and Chatdarong [22,23] and Martins et al. [15], who both found that approximately 80% of their preserved cells were normal. The ACP-106c extender best preserved the sperm morphology immediately after sperm recovery, as opposed to after 12 h of storage, and it was always better when compared to TRIS. Over time, the morphological changes increased with both extenders. The percentage of abnormalities found in all groups was within the normal range described in the manual from the Brazilian College of Animal Reproduction [6]. In the present study, the proportion of sperm from the epididymal cauda with normal morphology indicates that this paper's methods of recovery and collection and use of ACP-106c were beneficial for these gametes.

The values found in the HOST differed neither for extenders nor for storage time. The assessment of membrane integrity by the hyposmotic test is simple [24], and some studies consider it an indication of fertility in species such as cattle [25] and wild boar [21]. In dogs, the correlation between the osmotic response and fertility *in vivo* or *in vitro* has not yet been established [20].

Conclusion

ACP-106c can be used as a good extender for freezing canine epididymal sperm, even showing a better performance than TRIS in some motility parameters and sperm morphology; moreover the freezing procedure must be performed immediately after sperm recovery.

Acknowledgments

We thank the Center for Zoonosis Control for allowing us to use animals from their kennel; the Ceará Foundation for the Support of Scientific and Technological Development (Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico – FUNCAP) for granting a doctoral scholarship to Antonio Cavalcante Mota Filho; the National Council for Scientific and Technological Development (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq) for granting a researcher scholarship to Lúcia Daniel Machado da Silva; and the Carnivore Reproduction

Laboratory for their financial support for the development of these studies.

References

- [1] R.P. Arruda Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozoide equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA). 2000. 121f. Thesis (Habilitation). Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, São Paulo, 2000.
- [2] C.C. Barbosa, V.L.H. Madeira, R.P. Jucá, A.C. Oliveira, D.C. Uchoa, L.D.M. Silva, Criopreservação de sêmen canino com um diluidor à base de água de coco na forma de pó (ACP-106): Efeito da temperatura de adição do glicerol (27 e 4 °C). *Ciência Anim. Bras.* 10 (2009) 1209–1217.
- [3] L. Bogliolo, I.G. Leoni, S. Ledda, S. Naitana, M. Zedda, A. Carluccio, S. Pau, Intracytoplasmic sperm injection of *in vitro* matured oocytes of domestic cats with frozen-thawed epididymal spermatozoa. *Theriogenology* 56 (2001) 955–967.
- [4] J.F.S. Cardoso, N.R.O. Paula, D.C. Uchoa, L.D.M. Silva, Diferentes concentrações de gema de ovo na qualidade do sêmen canino diluído em ACP®-106 e resfriado a 4 °C. *Comunicata Scientiae* 1 (2010) 146–152.
- [5] R.C.S. Cardoso, A.R. Silva, L.D.M. Silva, V.H. Chirinéa, F.F. Souza, M.D. Lopes, Evaluation of fertilizing potential of frozen-thawed dog spermatozoa diluted in ACP-106 using an *in vitro* sperm–oocyte interaction assay. *Reprod. Domest. Anim.* 42 (2007) 1–16.
- [6] CBRA, Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal, 2ª ed., Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, Belo Horizonte, 1998, p. 49p.
- [7] D.A. Hewitt, R. Leahy, I.M. Sheldon, G.C. England, Cryopreservation of epididymal dog sperm. *Anim. Reprod. Sci.* 67 (2001) 101–111.
- [8] C. Holt, W.V. Holt, H.D. Moore, H.C. Reed, R.M. Cumock, Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: results of two fertility trials. *J. Androl.* 18 (1997) 312–323.
- [9] T. Hori, K. Hagiuda, E. Kawakami, T. Tsutsui, Unilateral intrauterine insemination with prostatic fluid-sensitized frozen caudal epididymal sperm in beagle dogs. *Theriogenology* 63 (2005) 1573–1583.
- [10] K. Kikuchi, T. Nagai, N. Kashiwazaki, H. Ikeda, J. Noguchi, A. Shimada, Cryopreservation and ensuing *in vitro* fertilization ability of boar spermatozoa from epididymides stored at 4 °C. *Theriogenology* 50 (1998) 615–623.
- [11] T. Kolbe, W. Holtz, Intracytoplasmic injection (ICSI) of *in vivo* or *in vitro* matured oocytes with fresh ejaculated or frozen-thawed epididymal spermatozoa and additional calcium-ionophore activation in the pig. *Theriogenology* 52 (1999) 671–682.
- [12] L.E. Laguna, Determinações físico-químicas da água de coco verde em duas variedades “Cocos nucifera” coco da praia e anão. 1996. Monografia (Especialização em Produção e Reprodução de Pequenos Ruminantes) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 1996.
- [13] F.A. Lone, R. Islam, M.Z. Khan, K.A. Sofi, Effect of transportation temperature on the quality of cauda epididymal spermatozoa of ram. *Anim. Reprod. Sci.* 123 (2011) 54–59.
- [14] M.J.M. Martins, R.C. Justino, M.C. Sant’Anna, L.G.C. Trautwein, F.F. Souza, Comparison of two different extenders for cryopreservation of epididymal dog sperm. *Reprod. Domest. Anim.* 47 (2012) 293–294.
- [15] C.F. Martins, K. Driessen, C.P. Melo, J.O. Carvalho-Neto, R.V. Sousa, R. Rumpf, M.N. Dode, Recovery cryopreservation and fertilization potential of bovine spermatozoa obtained from epididymides stored at 5 °C by different periods of time. *Anim. Reprod. Sci.* 116 (2009) 50–57.
- [16] C.F. Martins, R. Rumpf, D.C. Pereira, M.N. Dode, Cryopreservation of epididymal bovine spermatozoa from dead animals and its uses *in vitro* embryo production. *Anim. Reprod. Sci.* 10 (2007) 326–331.
- [17] A.C. Mota Filho, H.V.R. Silva, L.A. Freitas, T.G.P. Nunes, A.A. Araújo, L.D.M. Silva, Refrigeração do epidídimo canino a 4 °C e recuperação dos espermatozoides epididimários utilizando ACP-106c. *Pesqui. Vet. Bras.* 33 (2013) 1155–1160.
- [18] A.C. Mota Filho, C.H.A. Teles, R.P. Jucá, J.F.S. Cardoso, D.C. Uchoa, C.C. Campello, A.R. Silva, L.D.M. Silva, Dimethylformamide as a cryoprotectant for canine semen diluted and frozen in ACP-106C. *Theriogenology* 76 (2011) 1367–1372.
- [19] R.D. Oates, S.M. Lobel, D.H. Harris, S. Pang, C.M. Burgess, R.S. Carson, Efficacy of intracytoplasmic sperm injection using intentionally cryopreserved epididymal spermatozoa. *Hum. Reprod.* 11 (1996) 33–138.
- [20] I. Peña-Martínez, Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Anim. Reprod. Sci.* 82–83 (2004) 209–224.
- [21] B. Perez-Llano, J.L. Lorenzo, P. Yenes, A. Trejo, P. Garcia-Casado, A short hyposmotic swelling test for the prediction of boar sperm fertility. *Theriogenology* 56 (2001) 387–398.
- [22] S. Ponglowhapan, K. Chatdarong, Effects of Equex STM PasteV on the quality of frozen-thawed epididymal dog spermatozoa. *Theriogenology* 69 (2008) 66–72.
- [23] S. Ponglowhapan, K. Chatdarong, Effects of Equex STM Paste on the quality of frozen-thawed epididymal dog spermatozoa. *Theriogenology* 69 (2008) 666–672.
- [24] A.T. Quintela, I.R.S. Oliveira, A.O. Souza, A.L. Gusmão, A.R. Silva, Water-induced hypo-osmotic test for the evaluation of canine sperm membrane integrity. *Anim. Reprod.* 7 (2010) 70–74.
- [25] S.G. Revell, R.A. Mrode, An osmotic resistance test for bovine semen. *Anim. Reprod. Sci.* 36 (1994) 77–86.

- [26] J. Saragusty, H. Gacitua, R. King, A. Arav, Post-mortem semen cryopreservation and characterization in two different endangered gazelle species (*Gazella gazella* and *Gazella dorcas*) and one subspecies (*Gazella gazelle acaiae*), *Theriogenology* 66 (2006) 775–784.
- [27] S. Schäfer-Somi, C. Aurich, Use of a new computer-assisted sperm analyzer for the assessment of motility and viability of dog spermatozoa and evaluation of four different semen extenders for predilution, *Anim. Reprod. Sci.* 102 (2007) 1–13.
- [28] A.R. Silva, R.C.S. Cardoso, L.D.M. Silva, Influence of temperature during glycerol addition and post thaw dilution on the quality of canine frozen semen, *Reprod. Domest. Anim.* 41 (2006) 74–78.
- [29] A.R. Silva, R.C.S. Cardoso, L.D.M. Silva, V.H. Chirinea, M.D. Lopes, F.F. Souza, Prognostic value of canine frozen thawed semen parameters on in vitro sperm oocyte interactions, *Theriogenology* 66 (2006) 456–462.
- [30] M.A. Silva, G.C.X. Peixoto, E.A.A. Santos, T.S. Castelo, M.F. Oliveira, A.R. Silva, Recovery and cryopreservation of epididymal sperm from agouti (*Dasyprocta aguti*) using powdered coconut water (ACP-109c) and Tris extenders, *Theriogenology* 76 (2011) 1084–1089.
- [31] V.L. Slott, S.C. Jeffay, C.J. Dyer, R.R. Barbee, S.D. Perreault, Sperm motion predicts fertility in male hamsters treated with alpha-chlorohydrin, *J. Androl.* 18 (1997) 708–716.
- [32] D.C. Hchoa, T.F.P. Silva, J.F.S. Cardoso, A.C. Mota Filho, R.P. Jucá, A.R. Silva, L.D.M. Silva, Favoring the birth of female puppies after artificial insemination using chilled semen diluted with powdered coconut water (ACP-106c), *Theriogenology* 77 (2012) 1959–1963.
- [33] S. Varesi, V. Vernocchi, M. Faustini, G.C. Luvoni, Quality of canine spermatozoa retrieved by percutaneous epididymal sperm aspiration, *J. Small Anim. Pract.* 54 (2013) 87–91.
- [34] J. Versteegen, M. Iguer-Ouada, K. Onclin, Computer assisted analyzers in andrology research and veterinary practice, *Theriogenology* 57 (2002) 149–179.
- [35] D.E. Wildt, Genetic resource banks for conserving wildlife species: justification, examples and becoming organized on a global basis, *Anim. Reprod. Sci.* 28 (1992) 247–257.

8. CONCLUSÕES

- A qualidade espermática de células obtidas do CTE canino pode ser conservado até 18 horas sob-refrigeração a 4°C , preservando a qualidade espermática pós coleta e diluição. Contudo, visando utilização em inseminação artificial, a conservação até 12 horas apresenta qualidade seminal aceitável em ambos os diluidores.
- O diluidor ACP-106c foi eficiente para preservação in vitro dos espermatozoides canino pós-recuperação a 37 °C, permitindo uma boa avaliação dos parâmetros de motilidade espermática.
- ACP-106c pode ser usado como um bom diluidor para o congelamento de espermatozoides do epidídimo canino.
- O procedimento de congelação deve ser realizada imediatamente após a recuperação de espermatozoides sem armazenar o epididimo a 4°C por 12h.

9. PERSPECTIVAS

- Os espermatozoides refrigerados oriundos da cauda do epididimo de cães deve ser avaliado através de testes in vivo, como a inseminação artificial para a confirmação dos resultados obtidos in vitro, verificando-se a preservação do poder fecundante desses espermatozoides.
- ACP-106c por ter desempenho melhor do que TRIS na congelação em alguns parâmetros de motilidade e morfologia espermática, espera-se que o mesmo possa ser utilizado em breve em bancos de germoplasma para programas futuros de conservação.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKE-LOPEZ, J. E. CAVAZOS-ARIZPE, J.G. MAGANA-MONFORTE, F. CENTURION-CASTRO AND C. SILVA-MENA. Effect of Age and Postmortem Time on Some White-Tailed Deer (*Odocoileus virginianus texanus*) Epididymal Sperm Characteristics and Response of Cryopreservation. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences* 5 (3): 183-186, 2010

AMANN, R. P.; KATZ, D. F. Reflections on CASA after 25 years. *Journal of Andrology*, v. 25, p. 317-325, 2004

ARRUDA, R.P. Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide equino pelo uso de microscopia de epiufluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA). 2000. 121f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000

ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C. Validação de uma técnica para avaliação simultânea das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozoides bovinos. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.31, (supl), p.230-231, 2003.

ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; PERES, K.R.; RAPHAEL, C.F.; NASCIMENTO, J., CELEGHINI, E.C.C. Biotécnicas aplicadas à avaliação do

potencial de fertilidade do sêmen eqüino. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.31, n.1, p. 8-16, 2007

AXNÉR E, HERMANSSON U, LINDE-FORSBERG C. The effect of Equex STM paste and sperm morphology on post-thaw survival of cat epididymal spermatozoa. *Ani Reprod Sci*, v.84 (1-2), p.179 – 191, 2004.

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

epididymal spermatozoa recovered by cauda epididymectomy of an immobilized lion. *Theriogenology*, v.53, p.325, 2000.

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

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.

CARDOSO RSC, SILVA AR, UCHOA DC, SILVA LDM. Cryopreservation of canine semen using a coconut water extender with egg yolk and three different glycerol concentrations. *Theriogenology* 2003;59:743–51.

CARDOSO RCS, SILVA AR, SILVA LDM, CHIRINÉA VH, SOUZA FF, LOPES MD. Evaluation of fertilizing potential of frozen-thawed dog spermatozoa diluted in ACP-106® using an in vitro sperm-oocyte interaction assay. *Reprod Domest Anim* 2007;42:11–6.

CARY, J.A., MADILL, S., FARNSWORTH, K., HAYNA, J.T., DUOOS, L., FAHNING, M.L., 2004. A comparison of electroejaculation and epididymal sperm collection techniques in stallions. *Can. Vet. J.* 45, 35–41.

CASTELO TS, BEZERRA FSB, SOUSA ALP, MOREIRA MAP, PAULA VV, OLIVEIRA MF. Influence of the thawing rate on the cryopreservation of semen from collared peccaries (*Tayassu tajacu*) using tris-based extenders. *Theriogenology* 2010;74: 1060–5.

CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2.ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49p.

CELEGHINI, E.C.C. Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina utilizando sondas fluorescentes. 2005. 190f., Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e

Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2005.

CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; NASCIMENTO; J.RAPHAEL, C.F. Practical Techniques for Bovine Sperm Simultaneous Fluorimetric Assessment of Plasma, Acrosomal and Mitochondrial Membranes. *Reproduction in Domestic Animals*, v.42, p.479–488, 2007.

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

CONCANNON PW, BATTISTA M. Canine Semen Freezing and Artificial Insemination, In: *Current Veterinary Therapy – Small Animal Practice*, Kirk RW (Ed.), Saunders, 1989, pp. 1247–59.

CONTRI A., A. GLORIA, D. ROBBE, I. DE AMICIS, A. CARLUCCIO. Characteristics of donkey spermatozoa along the length of the epididymis.doi:10.1016/j.theriogenology.2011.07.031

DERIVAUX J. Reprodução dos animais domésticos.[Reproduction of Domestic Animals].Acribia, 1980.

FARRELL, P.B., PRESIW, G.A., BROCKETT, C.G., et al. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology*, v.49, p.871-979, 1998.

FARSTAD, W. Sêmen cryopreservation in dogs and foxes. *Animal Reproduction Science*, v.42, p.251-260, 1996.

FERNANDEZ-SANTOS, M.R.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; MATIAS, D.;MDOMINGUEZ-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.

FERREIRA M, 2006: Efeito da suplementação de hCG, progesterona e estradiol na maturação nuclear e citoplasmática in vitro de oócitos de cadelas (*Canis familiaris*) obtidos por ovariectomia-histerectomia. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista - Campus de Jaboticabal.

FOOTE, R.H. Extenders for freezing dog semen. *American Journal of Veterinary Research*, v.25, p.32-36, 1964.

FOOTE, R.H.; LEONARD, E.P. The influence of pH, osmotic pressure, glycine, and glycerol on the survival of dog sperm in buffered- yolk extenders. *Cornell Veterinary*, v.54, p.78-89, 1964.

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.

GARNER, D. L.; JOHNSON, L. A. Viability Assessment of Mammalian Sperm Using SYBR-14 and Propidium Iodide. *Biology of Reproduction*, v. 53, p. 276-284, 1995

GRAHAM, J.K.; KUNZE, E.; HAMMERSTEDT, R.H. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. *Biology of Reproduction*, v.43, p.55-64, 1990.

GOODROWE, K.L., HAY, M. Characteristics and zona binding ability of fresh and cooled domestic cat epididymal spermatozoa. *Theriogenology* 40, 967–975; 1993.

GRANEMANN, L.C. Avaliação comparativa do sêmen equino colhido com vagina artificial e por lavado intraluminal da cauda do epidídimo pós-orquiectomia. 2006. 48f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

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

HEISE, A., KÄHN, W., VOLKMANN, D.H., THOMPSON, P.N., GERBER, D., Influence of seminal plasma on fertility of fresh and frozen-thawed stallion epididymal spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 118, 48–53., 2010.

HEISE, A., P.N. THOMPSON, D. GERBER., Influence of seminal plasma on fresh and post-thaw parameters of stallion epididymal spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* (2011), doi:10.1016/j.anireprosci.2010.11.017

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

HEWITT DA, LEAHY R, SHELDON IM, ENGLAND GC. Cryopreservation of epididymal dog sperm. *Animal Reproduction Science*, v.67, p.101-111, 2001.

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

HORI T, HAGIUDA K, KAWAKAMI E, TSUTSUI T. Unilateral intrauterine insemination with prostatic fluid-sensitized frozen caudal epididymal sperm in beagle dogs. *Theriogenology* 2005;63: 1573–83.

IGUER-OUADA M, VERSTEGEN JP. Long-term preservation of chilled canine semen: effect of commercial and laboratory prepared extenders. *Theriogenology* 2001;55:671–84.

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

E. JIMÉNEZ, C.C.PÉREZ-MARÍN, Y.MILLÁN, E.AGÜERA. Influence of anaesthetic drugs on the epididymal sperm quality in domestic cats. *Anim. Reprod. Sci.* (2011), doi:10.1016/j.anireprosci.2011.01.006

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

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

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

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

KOLBE, T & HOLTZ, W. 1999. Intracytoplasmic injection (ICSI) of in vivo or in vitro matured oocytes with fresh ejaculated or frozen-thawed epididymal spermatozoa and additional calcium-ionophore activation in the pig. *Theriogenology*, v.52, p.671-682.

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

LIMA, G.L., MOTA-FILHO, A.C., CASTELO, T.S., COSTA, L.L.M., SILVA, A.R. Uso do corante azul de bromofenol na avaliação da morfologia espermática de cães. In: FEIRA DE CIÊNCIA, CULTURA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO DO ESTADO DO CEARÁ, 3, 2007. Anais... Fortaleza: Pró Reitoria de Pós Graduação e Pesquisa da UECE. 2007. p.1.

LONE F.A., R. ISLAM, M.Z. KHAN, K.A. SOFI. Effect of transportation temperature on the quality of cauda epididymal spermatozoa of RAM. *Animal Reproduction Science* V. 123; P. 54–59. 2011.

MADEIRA, V. L. H.; CARDOSO, J. F. S.; SILVA, A. R.; UCHOA, D. C.; CARDOSO, R. C. S.; OLIVEIRA, C. M.; L. D. M. Uso da água de coco em pó (ACP®) como diluidor para a conservação do sêmen a 4° C XIII Encontro de Iniciação Científica, In. Anais da IX Semana Universitária da UECE.Fortaleza , 2004.

MARKS, S.L., J. DUPUIS, W.D. MICKELSON, M.A. MEMON, AND C.C. PLATZ, JR. Conception by use of postmortem epididymal semen extraction in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 204:1639-1640; 1994.

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

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

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

MARTINS, M.I.M.; SOUZA, F.F.; CHIRINÉA, V.H.; TEBET, J.M.; LOPES M.D.

Viabilidade de espermatozóides criopreservados, obtidos do epidídimo de cães. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.27, n.3, p.367-368, 2003.

MARTINS MM, JUSTINO RC, PERERIA FD, PERCHES CS, CHIRINÉA VH, LOPES MD. The effect of two solutions in the morphological characteristics and in the freezing of spermatozoa obtained from epidymis of dogs and cats: preliminary results. *Animal Reproduction*, v.3, p.265, 2006.

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. *Anim. Repro. Sci.*, 018, doi:10.1016/j.anireprosci.2008.12., 2009.

MAXWELL, W.M.C.; WELCH, G.R.; JOHNSON, L.A. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reproduction, fertility, and development*, v.8, p.1165-1178, 1997.

MELO, C.M., PAPA, F.O., FIORATTI, E.G., VILLAYERDE, A.I.S.B., AVANZI, B.R., MON- TEIRO, G., DELL'AQUA JR., J.A., PASQUINI, D.F., ALVARENGA, M.A..Comparison of three different extenders for freezing epididymal stallion sperm. *Anim. Reprod. Sci.* 107, 331. , 2008

MONTEIRO, G.A.; GUASTI, P.N.; MELO, C.M.; DELLAQUA JUNIOR, J.A.; PAPA, F.O. Comparison between viability of sperm obtained with artificial insemination and recovered from epididymal cauda of subfertile stallions. In: In: CONGRESS OF THE WORLD EQUINE VETERINARY ASSOCIATION - WEVA, 11., Guarujá. Proceedings ... Guarujá, 2009b, 1 CD – Rom.

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

NEILD, D., MIRAGAYA, M., CHAVES, G., PINTO, M., ALONSO, A., GAMBAROTTA, M., LOSINNO, L., AGÜERO, A., 2006. Cryopreservation of cauda epididymis spermatozoa from slaughterhouse testicles 24 hours after ground transportation. *Anim. Reprod. Sci.* 94, 92.

NUNES, J.F.; SALGUEIRO, C.C.M.; GONDIM, J.M. Novos produtos com base na água de coco em pó. In: 12a SEMANA INTERNACIONAL DA FRUTICULTURA, FLORICULTURA E AGROINDÚSTRIA - FRUTAL 2005, Fortaleza. Anais ..., Fortaleza: FRUTAL, 2005.

OATES, R.D., LOBEL, S.M., HARRIS, D.H., PANG, S., BURGESS, C.M., CARSON, R.S. Efficacy of intracytoplasmic sperm injection using intentionally cryopreserved epididymal spermatozoa. *Hum. Reprod.* 11, 133–138., 1996

OLIVEIRA, E.C.S. Efeito de diferentes diluidores sobre a congelação do sêmen canino. Belo Horizonte: Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Minas Gerais, 2003, 61p.

PAPA, F.O., MELO, C.M., FIORATTI, E.G., DELL'AQUA JR., J.A., ZAHN, F.S., ALVARENGA, M.A., Freezing of stallion epididymal sperm. *Anim. Reprod. Sci.* 107, 293. , 2008.

PEÑA-MARTINEZ, I. Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Anim Reprod Sci*, v.82- 83, p.209-224, 2004.

PEREZ-LLANO, B., LORENZO, J.L., YENES, P., TREJO, A., GARCIA-CASADO, P. A short hyposmotic swelling test for the prediction of boar sperm fertility. *Theriogenology* v.56, p.387- 398, 2001

REVEL, S.G., MRODE, R.A. An osmotic resistance test for bovine semen. *Anim. Reprod. Sci.* v.36, p.77-86, 1994

RIJSSELAERE, T., SOOM, A.V., TANGHE, S., CORYN, M., MAES, D., KRUIF, A., 2005. New techniques for the assessment of canine semen quality: A review.

Theriogenology, 64, p.706-719.

RIJSSELAERE T.; MAES, D.; HOFLACK, G.; KRUIF, A.; SOOM, A.V. Effect of body weight, age and breeding history on canine sperm quality parameters measured by the Hamilton-Thorne Analyser. *Reproduction in Domestic Animals*, v.42, p.143–148, 2007.

RODRIGUES, B.A. Efeito do diluidor à base de albumina sérica bovina (BSA) sobre a viabilidade in vitro do sêmen canino criopreservado. 1997. 176f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Porto Alegre.

ROTA, A.; MILANI, C.; CABIANCA, G.; MARTINI, M. Comparason between glycerol and ethilene glycol for dog sêmen cryopreservation. *Theriogenology*, v.65, p.1848-1858, 2006.

PING S., F. WANG, Y. ZHANG, C. WU, W. TANG, Y. LUO, S. YANG. Cryopreservation of epididymal sperm in tree shrews (*Tupaia belangeri*) doi:10.1016/j.theriogenology.2011.01.011,

PONGLOWHAPAN S, CHATDARONG K. Effects of Equex STM PasteVon the quality of frozen-thawed epididymal dog spermatozoa. *Theriogenology* 2006 p:69:666 – 72.

SALGUEIRO, C. C. M.; NUNES, J. F.; OLIVEIRA, K. P. L.; VIEIRA, V. E.; GONDIM, J. M.; MATEOS-REX, E. Utilização de diluentes a base de água de coco “in natura” e em pó na inseminação artificial programada de cabras. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Supl n.5, p. 96-98, 2002.

SAMPAIO NETO, J. C.; SALGUEIRO, C. C. M.; MATEOS-REX, E.; NUNES, J. F. Utilização do diluente ACP-105® na refrigeração do sêmen eqüino. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Supl n.5, p.137-139, 2002.

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

SANTIAGO-MORENO J, TOLEDANO-DI’AZ A, PULIDO-PASTOR A, DORADO J,

GÓMEZ-BRUNET A, LÓPEZ-SEBASTIÁN A. Effect of egg yolk concentration on cryopreserving Spanish ibex (*Capra pyrenaica*) epididymal spermatozoa. *Theriogenology* 2006;66: 1219–26

.□SARAGUSTY, J. GACITUA, H. KING, R. ARAV, A. Post-mortem semen cryopreservation and characterization in two different endangered gazelle species (*Gazella gazella* and *Gazella dorcas*) and one subspecies (*Gazella gazelle acaiae*). *Theriogenology*, [S.l.], v. 66.p. 774- 784, 2006.

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

SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; SILVA, L.D.M. Congelação de sêmen canino com diferentes concentrações de gema de ovo e glicerol em diluidores à base de Tris e água de coco. *Ciência Rural*, v. 6, p.1021-1025, 2000.

SILVA, A.R. Criopreservação do sêmen canino diluído em Tris: Avaliação morfológica, funcional e de suas interações com oócitos homólogos. 2005. 146p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2005

SILVA AR, CARDOSO RSC, SILVA LDM. Influence of temperature during glycerol addition and post thaw dilution on the quality of canine frozen semen. *Reprod Domest Anim* 2006;41:74–8.

M.A. Silva, G.C.X. Peixoto, E.A.A. Santos, T.S. Castelo, M.F. Oliveira, A.R. Silva. Recovery and cryopreservation of epididymal sperm from agouti (*Dasiprocta aguti*) using powdered coconut water (ACP-109c) and Tris extenders. doi:10.1016/j.theriogenology.2011.05.014

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

SOUSA, D.B. Variabilidade das sub-populações de espermatozóides avaliadas pela cinética em sistema computadorizado e combinação de sondas fluorescentes como parâmetro qualitativo do sêmen congelado de ovinos. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.

SPITTALER, P.J.; TYLER, J.P.P. Further evaluation of a simple test for determining the integrity of spermatozoal membrane. *Clinics Reproduction and Fertility*. v.3, p.187-190, 1985.

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

TAMAYO-CANULA J., M. ALVAREZA, E. LÓPEZ-URUEÑA, M. NICOLASA, F. MARTINEZ-PASTORA, E. ANELA, L. ANELA, P. DE PAZ. Undiluted or extended storage of ram epididymal spermatozoa as alternatives to refrigerating the whole epididymides. *Animal Reproduction Science* v. 126 p:76–82. 2011.

TARDIF, A. L.; FARRELL, P. B.; TROUERN-TREND, V.; FOOTE, R. H. Computer-assisted sperm analysis for assessing initial semen quality and changes during storage at 5° C. *Journal of dairy science*, v. 80, p. 1606-1612, 1997.

TEBET J, MARTINS MI, CHIRINEA V, SOUZA F, CAMPAGNOL D, LOPES M. Cryopreservation effects on domestic cat epididymal versus electroejaculated spermatozoa. *Theriogenology*, v.66 (6-7) , p.1629 – 1632, 2006.

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

TITTARELLI C, SAVIGNONE CA, ARNAUDÍN E, STORNELLI MC, STORNELLI MA, SOTA RL. Effect of storage media and storage time on survival of spermatozoa recovered from canine and feline epididymides. *Theriogenology*, v.66, p.1637-1640,

2006.

TSUTSUI T, WADA M, ANZAI M, HORE T. Artificial insemination with frozen epididymal sperm in cats. *J Vet Med Sci* ;65: 397–9., 2003.

UCHOA,D.C.; SILVA, T.F.P.; ARAÚJO,A.A., SILVA, L.D.M. Uso da água de coco em pó (ACP-106 ®) na inseminação artificial com sêmen a fresco em cadelas. In: IX SEMANA UNIVERSITÁRIA-UECE, 2004, Fortaleza. Anais... Fortaleza, UECE,2004.

UCHOA,D.C.; SATIZINNGER, S.; AMARAL, M.C.; SILVA,L.D.M. O uso de diferentes diluidores para inseminação artificial com sêmen canino refrigerado. In:CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 17., 2007, Curitiba. Anais...Belo Horizonte, CBRA, 2007

VERTEGEN, J., IGUER-OUADA, M., ONCLIN, K., 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, 57, 149 179.

WATSON, P.F.; PLUMMER, J.M.The response of boar sperm membranes to cold shock and cooling, *Proceedings, 1st. Int. Conf. On Deep Freezing of Boar Semen*, p. 113 – 127,1985

WILDT, D.E., 1992. Genetic resource banks for conserving wildlife species:justification, examples and becoming organized on a global basis. *Anim. Reprod. Sci.* 28, 247–257.

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

WAHEEDA M.M.,, M.M. AL-EKNAHA, S.M. EL-BAHR. Some Biochemical Characteristics and Preservation of Epididymal Camel Spermatozoa (*Camelus dromedarius*).doi:10.1016/j.theriogenology.2011.05.021

YU, I.; LEIBO, S. Recovery of motile, membrane-intact spermatozoa from canine

epididymides stored for 8 days at 4 oC. Theriogenology, v.57, p.1179-1190, 2002.

ZAMBELLI, D.; CUNTO, M. Semen collection in cats: Techniques and analysis. Theriogenology, v.66, p.159-165, 2006.

11.APENDICE

Abstract submitted for the 2014 meeting of the Society for the Study of Reproduction (SSR)

Detection of relaxin and its receptor proteins in dog epididymal tissues and spermatozoa

Antonio CM Filho^{1,3}, Ramey C Youngblood¹, John Stokes², Darby S Dillard¹, Lúcia DM da Silva³, Scott T Willard^{1,4}, Peter L Ryan^{1,2}, Jean M Feugang¹

Department of Animal and Dairy Sciences, Mississippi State University, Mississippi State, Mississippi, USA¹, College of Veterinary Medicine, Mississippi State University, Mississippi State, Mississippi, USA², Laboratory Reproduction of Carnivores, Ceará State University-UECE, Fortaleza, Brazil³, Department of Biochemistry, Molecular Biology, Entomology and Plant Pathology, Mississippi State University, Mississippi State, Mississippi, USA⁴

Upon its discovery several decades ago, relaxin peptide was characterized as a hormone of pregnancy. At present, its detection and pleiotropic effects have been reported in various reproductive and non reproductive tissues of both males and females, in a broad range of species. Relaxin functions are better described in females and compelling data indicate beneficial roles on sperm quality after ejaculation. Although relaxin immunoreactivity is found with seminal plasma, little is known about its presence in epididymal spermatozoa. The current study focuses on the detection of relaxin and its receptors RXFP1 and RXFP2 in testicular tissues and spermatozoa of domestic dogs.

Testicles of four dogs, aged of approximately 1.5 year, were obtained from a local Animal Shelter after neuter surgeries. After transportation to the laboratory in sealed plastic bags containing 0.9% NaCl saline solution supplemented with penicillin/streptomycin (22-25°C), specimens were washed and immersed in fresh saline

solution at room temperature. Testes were sliced (1cm x 1cm) and epididymides were excised for anatomical dissections (caput, corpora and cauda, including vas deferens). Together with spermatozoa of each epididymal section, all specimens were processed for protein analyses. Immunohistochemistry (IHC) and Western immunoblotting (WIB) techniques were applied on samples that were fixed in 4% formaldehyde or snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -20°C , respectively. Immunodetection was performed on total protein (WIB) or fixed samples (IHC) of each biological specimen, using anti-human relaxin, RXFP1 and RXFP2 (Santa Cruz Biotech). Mixed protein samples of porcine ovary, uterine and cervix served as positive controls. Labeled spermatozoa were subjected to both flow cytometry and confocal microscope analyses, while labeled tissues were observed under a confocal microscope.

After WIB, bands corresponding to RXFP1 and RXFP2 receptors were detected in all samples (testis and epididymis), and both pig and dog immunoblots showed similar protein profiles. Immunohistology images revealed higher signal detection in various areas of the testis, with relaxin and RXFP2 seen in the interstitium (or Leydig cells) and RXFP1 in Sertoli cells. The presence of relaxin and receptors was lower and detected at differential levels in various sections of the epididymis. Targeted-proteins were barely detectable above background levels in the caput (relaxin, RXFP2), corpora (RXFP1, RXFP2), and cauda (relaxin). Flow cytometry revealed weaker immunoreactivity in spermatozoa, with less than 25% of cells being immunopositive. Irrespective of the antibody, lowest proportions of labeled-spermatozoa were found in the cauda ($< 2\%$), while 81% appeared RXFP2-immunopositive in the vas deferens. These latter results were confirmed by fluorescence microscopy, showing lower intensities in epididymal spermatozoa and higher RXFP2 signal in the vas deferens.

In conclusion, the findings (1) suggest that anti-human relaxin, RXFP1 and RXFP2 antibodies can be used in dogs and (2) indicate variable detection of relaxin and its receptors in dog testes and epididymal tissues and spermatozoa. Further studies are needed to investigate the biological relevance of RXFP2 on spermatozoa in the vas deferens.

Special thanks to the Starkville Shelter Medicine Spay Neuter's staff, MS. Work supported by the USDA-ARS Grant#58- 6402-3-0120 and CAPES-Brazil.

Filho et al., Submitted to the 2014 IETS meeting

Differential Expression of aquaporins and spermadhesins in frozen-thawed “good” and “poor” freezer boar spermatozoa

Antonio CM Filho^{1,2,3}, Rebecca M Brezinsky^{1,4}, Ramey C Youngblood^{1,2}, Lúcia M da Silva³, Scott T Willard^{1,5}, Peter L Ryan^{1,2,4}, Jean M Feugang^{1,2}

Facility for Organismal and Cellular Imaging, Mississippi State University, Mississippi State, Mississippi, USA¹, Department of Animal and Dairy Sciences, Mississippi State University, Mississippi State, Mississippi, USA², Laboratory Reproduction of carnivores Ceará State University-UECE, Fortaleza, Brazil³, College of veterinary School, Mississippi State University, Mississippi State, Mississippi, USA⁴, Department of Biochemistry, Molecular Biology, Entomology and Plant Pathology, Mississippi State University, Mississippi State, Mississippi, USA⁵

Cryopreservation is an excellent tool for sperm banking in livestock animals. Although its utilization is widespread in species such as cattle, its application in pigs is limited due to various factors associated with either cryopreservation techniques or male-to-male variations. Indeed, the existence of so-called “good” and “poor” freezer males has been well- established in swine and yet, the potential to screen for these characteristics is still being investigated. Few studies have reported the existence of molecular differences between both groups of boar spermatozoa, at nucleic acid and protein levels. Here we hypothesize that cryotolerance in sperm may be associated with differential expression of proteins involved in membrane transport and or sperm capacitation. Thus, we conducted this study to compare the expression of spermadhesins, aquaporins (AQP) and glucose (GLUT) transporters in frozen-thawed spermatozoa of “good” and “poor” freezer boars.

Frozen-thawed spermatozoa harvested from known “poor” and “good” freezer boars (n=4) were purified using a percoll gradient and washed three times with PBS/PVP

(1mg/ml). Sperm denuded of any somatic cells contamination were used for experiments. In parallel, female genital tracts and testes were collected from euthanized pigs and, uterine and cervical epithelial cells were collected and testis slices were prepared for experiments. Total RNA extraction was performed in three different occasions for each sample, followed by cDNA synthesis (Qiagen kits). Primer sets designed for the detection of AQP isoforms 1 to 11, GLUT-3 and GLUT-5, and spermadhesins (AQN-1, AWN-1, SPM-1, PSP-1, PSP-2) were used for semi-quantitative PCR with GAPDH serving as an internal control. All PCR amplicons were resolved and visualized using gel electrophoreses.

Amplicons corresponding to water (AQP-1, -5, and -11) and glycerol (AQP-3, -7, -9, and -10) transmembrane transportation, as well as GLUT-3 were detected in all samples. Spermadhesin amplicon bands were detected in all sperm samples with differential intensities. Indeed, “good freezer” spermatozoa had higher AWN-1 and AQN-1 band intensities, but lower PSP-2 compared to “poor freezers”. Both groups of sperm had comparable SPM-1 and PSP-1 band intensities, and regardless of samples, PSP-1 band intensities were stronger than PSP-2. Furthermore, preliminary qPCR data indicated that AQP-10 was significantly lower in good freezer spermatozoa ($P < 0.05$).

The findings indicate that frozen-thawed boar spermatozoa express aquaporins and glucose transporter transcripts that are essential for transmembrane fluxes occurring during cryopreservation. Additionally, the detection of spermadhesin transcripts in spermatozoa raises question about their implication during the early capacitation of frozen-thawed spermatozoa. Differential expression of these genes brings additional evidence which may contribute to a better description of “good freezer” from “poor freezer” boar spermatozoa. Further investigations are still undergoing for a full characterization of these genes in boar spermatozoa.

Support by the USDA-ARS Grant#58-6402-3-0120

12. ANEXOS