



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CÂMPUS DE BOTUCATU

**EFEITO DO PLASMA SEMINAL SOBRE A LIGAÇÃO DE
ESPERMATOZOIDES DA CAUDA DO EPIDÍDIMO EQUINO AOS
EXPLANTES DA TUBA UTERINA**

LUCAS EMANUEL FERREIRA CANUTO

Botucatu, São Paulo

Março de 2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

**EFEITO DO PLASMA SEMINAL SOBRE A LIGAÇÃO DE
ESPERMATOZOIDES DA CAUDA DO EPIDÍDIMO EQUINO AOS
EXPLANTES DA TUBA UTERINA**

LUCAS EMANUEL FERREIRA CANUTO

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Biotecnologia Animal para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa

Botucatu, São Paulo
Março de 2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Canuto, Lucas Emanuel Ferreira.

Efeito do plasma seminal sobre a ligação de espermatozoides da cauda do epidídimo equino aos explantes da tuba uterina / Lucas Emanuel Ferreira Canuto. - Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Frederico Ozanam Papa

Capes: 50504037

1. Equino - Reprodução. 2. Sêmen. 3. Cinética. 4. Tubas uterinas. 5. Espermatozoides. 6. Epidídimo.

Palavras-chave: Cinética espermática; Garanhão; Teste de ligação.

Nome do Autor: Lucas Emanuel Ferreira Canuto

Título: EFEITO DO PLASMA SEMINAL SOBRE A LIGAÇÃO DE
ESPERMATOZOIDES DA CAUDA DO EPIDÍDIMO EQUINO AOS
EXPLANTES DA TUBA UTERINA

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa

Orientador

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ- UNESP- Botucatu

Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ- UNESP- Botucatu

Dr. Márcio Teoro do Carmo

Membro

Haras Lub Breeding

Data da defesa: 12 de Março de 2019

Agradecimentos

A Deus, por ter colocado pessoas tão especiais e importante no meu caminho.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP, Campus de Botucatu pela oportunidade concedida.

À Universidade Federal de Alagoas, pela minha formação acadêmica fundamental em meus avanços profissionais.

Ao CNPq pela bolsa de estudo concedido durante o projeto de pesquisa, e a Botupharma pela doação de materiais para execução da pesquisa.

Aos meus pais, Josué Canuto e Josefa Ferreira, e minhas irmãs Bárbara e Débora, pelo total apoio e amor incondicional.

Ao meu orientador professor Frederico Ozanam Papa, pela amizade e ensinamentos preciosos desde a residência, grande exemplo de dedicação e profissionalismo, por ter confiado em minha capacidade profissional e minhas ideias durante esse experimento.

Aos Funcionários do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Edilson, Edvaldo, Felipe, e Dona Raquel, pelos bons momentos de convívio e pela ajuda.

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

Ao Professor Gabriel Monteiro da UFMG pelas diversas conversas e ajudas na idealização da pesquisa.

Ao Zezé Cruz por ter oferecido os animais para o experimento.

Ao frigorífico Frigonobre e aos funcionários que tornaram possível a coleta das tubas uterinas.

Aos Pós-graduandos Viviana Vallejo e Pablo Colômbia, que além de trocarem conhecimentos ajudaram de forma ativa nos testes de ligação da tuba uterina.

Aos Pós-graduandos da Cirurgia de Grandes animais, em especial Gabriel e Juliana por terem feito a parceria e castração dos animais.

A minha família de Botucatu, importantes em todos os momentos: Edjalma, Fernando, Humberto, Zero, Lucas Ceará, Arthur, David, Thaís, Verônica, Lucas Troncarelli, Sidney, Lorenzo, Rafael, Bruna, Luiza, Viviane, Felipe, Matheus, Hudson, Fábio.

A todos os Pós-Graduandos do Ceran pela ajuda, convivência, troca de conhecimentos, amizade que tornaram os dias tão agradáveis durante esse período.

Aos residentes, Bruna, Matheus, Débora, Eduardo, Lucas, Mariana, Amanda, Letícia, Gabriela, pela ajuda e troca de conhecimento durante esse ano.

Aos inúmeros estagiários que sempre ajudaram e trocaram conhecimentos e experiências.

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

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	1
INTRODUÇÃO	2
REVISÃO DE LITERATURA	3
1. Composição do ejaculado equino.....	3
2. Anatomia e fisiologia do epidídimo	4
3. Efeitos do plasma seminal sobre a viabilidade dos espermatozoides	4
4. Efeito do plasma seminal sobre a criopreservação do sêmen	5
5. Tuba uterina e o reservatório espermático	8
6. Efeito do PS sobre a ligação dos espermatozoides às células da tuba uterina	10
REFERÊNCIAS	13
CAPÍTULO 2.....	18
ARTIGO	19
Resumo	19
1. Introdução	20
2. Materiais e métodos	22
2.1. <i>Animais e local da pesquisa</i>	22
2.2. <i>Orquiectomia</i>	22
2.3. <i>Delineamento experimental</i>	23
2.4. <i>Processamento das amostras</i>	23
2.4.1. <i>Epidídimo</i>	23
2.4.2. <i>Plasma seminal</i>	24
2.4.3. <i>Colheita e cultura de células da tuba uterina</i>	24
2.5. <i>Avaliação espermática</i>	25
2.5.1. <i>Cinética espermática</i>	25
2.5.2. <i>Análise da integridade de membrana plasmática</i>	25
2.6. <i>Teste in vitro de ligação dos espermatozoides aos explantes</i>	26
2.7. <i>Análise Estatística</i>	26
3. Resultados	27
4. Discussão	28
5. Conclusão	31
6. Referências	32

CANUTO, L.E.F. EFEITO DO PLASMA SEMINAL SOBRE A LIGAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES DA CAUDA DO EPIDÍDIMO EQUINO AOS EXPLANTES DA TUBA UTERINA. Botucatu – SP. 2019. 42p. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

RESUMO

A recuperação de espermatozoides da cauda do epidídimo é uma das principais alternativas nos casos de óbito inesperado, eutanásia, processos obstrutivos ou castração terapêutica. Nessa técnica os espermatozoides não entram em contato com o plasma seminal, não incorporando seus constituintes, que interferem nos processos fisiológicos importantes para fertilização, como a ligação dos espermatozoides ao reservatório da tuba uterina, que aumenta a vida útil do espermatozoide e diminui as chances de poliespermia. Nesse sentido o objetivo do presente trabalho foi comparar a cinética e ligação da tuba uterina aos espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo com e sem adição de plasma seminal. Utilizou-se 8 garanhões da raça Minihorse para o resgate de espermatozoides da cauda do epidídimo pela técnica de fluxo retrógrado. Após a colheita foi dividido em 4 grupos, LD apenas com diluente a base de leite desnatado, GO recebeu adição de diluente para congelação a base de gema de ovo, PSB plasma seminal de garanhão com alta fertilidade e capacidade de refrigeração, e PSR plasma seminal de garanhão com fertilidade e capacidade de refrigeração inferiores. Foi avaliado cinética, integridade de membrana espermática e a taxa de ligação à explantes da tuba uterina. Não apresentaram diferença na integridade da membrana nem na taxa de ligação, no entanto, observou-se diferença quanto a cinética espermática. Conclui-se que a adição de plasma seminal de diferentes garanhões interferiu, de forma diferente na cinética de espermatozoides da cauda do epidídimo aumentando a motilidade total e progressiva e a porcentagem de espermatozoides rápidos. No entanto não foi observado diferença ($p < 0,05$) nas taxas de ligação de espermatozoides da cauda do epidídimo por área de explante entre os grupos que receberam e os que não receberam adição de plasma seminal.

Palavras-chave: garanhão, teste de ligação, cinética espermática

CANUTO, L.E.F. EFFECT OF SEMINAL PLASMA ON SPERMATOZOA BINDING FROM EQUINE EPIDIDYMIS TAIL TO UTERINE TUBA EXPLANTS. Botucatu – SP. 2019. 42p. São Paulo State University - School of Veterinary Medicine and Animal Science.

ABSTRACT

Sperm retrieval from the tail of the epididymis is one of the main alternatives in cases of unexpected death, euthanasia, obstructive processes, therapeutic castration. In this technique spermatozoa do not come into contact with the seminal plasma, not incorporating their constituents, which interfere in the physiological processes important for fertilization, such as sperm binding to the uterine tube reservoir, which increases sperm life and decreases the chances of polyspermia. In this sense, the objective of the present study was to compare the kinetics and uterine tubal attachment to the spermatozoa recovered from the tail of the epididymis with and without addition of seminal plasma. Eight minihorse stallions were used to retrieve spermatozoa from the tail of the epididymis by the retrograde flow technique. After harvesting was divided into 4 groups, LD only with diluent the skim milk base, GO received addition of diluent for freezing the egg yolk, PSB seminal stallion plasma with high fertility and cooling capacity, and PSR seminal plasma fertility and lower cooling capacity. Kinetics, spermatoc membrane integrity and the rate of binding to the explants of the uterine tube were evaluated. There was no difference in membrane integrity or binding rate, however, a difference was observed in spermatoc kinetics. It was concluded that the addition of seminal plasma of different stallions interfered, differently in spermatozoa kinetics of the tail of the epididymis increased total and progressive motility and the percentage of fast spermatozoa. However, no difference ($p < 0.05$) was observed in sperm binding rates of the tail of the epididymis per explant area between the groups that received and those not receiving addition of seminal plasma.

Key-words: stallion, bonding test, sperm motility

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

A utilização de biotecnologias aplicadas à espécie equina é uma maneira de acelerar o ganho genético e competitividade na indústria do cavalo, visando a conservação do material genético de animais de alto valor zootécnico para maximizar sua utilização. Dentre estas, pode ser destacada a recuperação de espermatozoides da cauda do epidídimo de reprodutores que sofreram algum trauma ou enfermidade que impossibilita a colheita do sêmen, ou que tenham vindo a óbito por causa natural ou eutanásia. Nestes casos, muitos proprietários têm buscado uma última recuperação dos gametas na tentativa de obter mais produtos com a genética valiosa daqueles animais.

Em 1957 foi relatada a primeira prenhez utilizando espermatozoides congelados na espécie equina, sendo em uma égua inseminada com espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo (BARKER e GANDIER, 1957). Apesar da fertilidade desses espermatozoides ser confirmada desde esse estudo ainda existem questionamentos quanto a sua capacidade de interação no sistema reprodutivo da fêmea, estimulando assim mais estudos nessa área.

Segundo Papa et al. (2008), os estudos com epidídimos equinos envolvem o desenvolvimento de técnicas de colheita, comparação de diferentes meios diluentes, refrigeração, viabilidade espermática após adição de plasma seminal, viabilidade espermática de garanhões subférteis, fertilidade e metodologias de inseminação e injeção intracitoplasmática desses espermatozoides.

Tanto os componentes moleculares dos espermatozoides quanto os dos meios que os cercam influenciam na capacidade fertilizante. As proteínas do plasma seminal, por exemplo, modulam funções e processos importantes na reprodução, como a cinética e capacitação espermática, proteção celular, reação acrossômica e fertilização (BOUÉ et al., 1996).

No entanto, espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo, independente da técnica, não entram em contato com o plasma seminal, logo não incorporam suas proteínas, lipídeos e íons que certamente participam de processos fisiológicos importantes para a fertilização.

Existem diversos estudos sobre os vários componentes bioquímicos do plasma seminal e progressos têm sido feitos especialmente no campo da proteômica. Contudo, pouco se sabe a respeito da importância destes na adesão dos espermatozoides

provenientes do epidídimo aos sítios de ligação das células epiteliais da tuba uterina da espécie equina.

Segundo Suarez, (2008), o reservatório espermático das fêmeas mamíferas está localizado principalmente na tuba uterina, na região do istmo. Suas funções ainda não estão completamente elucidadas, contudo as células espermáticas ficam retidas no reservatório espermático da tuba uterina.

Na espécie bovina, De Pauw et al. (2002) relataram diferentes taxas de ligação de espermatozoides a explantes da tuba uterina quando comparados diferentes touros, ressaltando a existência de fatores individuais que podem interferir na ligação. Também observaram uma correlação positiva entre a taxa de adesão dos espermatozoides às células da tuba e fertilidade do animal, sugerindo, que o teste *in vitro* de ligação poderia prever a fertilidade na espécie estudada.

Com base nessas informações, nota-se a importância e a necessidade de estudos na área para melhor compreensão da fisiologia espermática, esclarecimento das funções do plasma seminal na interação com os sítios de ligação das células epiteliais da tuba uterina, e consequentemente para melhorar a taxa de fertilidade dos espermatozoides equinos recuperados da cauda do epidídimo.

REVISÃO DE LITERATURA

1. Composição do ejaculado equino

O ejaculado é composto basicamente por duas porções diferentes: a porção celular que é composta pelos espermatozoides, corresponde menos de 1% do volume total, e a porção referente ao plasma seminal (PS), que constitui a parte líquida que oferece ao sêmen a maior parte do volume total (KARESKOSKI e KATILA, 2008).

O PS, conjunto de fluidos secretados pelos testículos, epidídimos e glândulas sexuais acessórias, está envolvido em variadas funções e também em eventos que precedem a fecundação (KARESKOSKI e KATILA, 2008).

Nos equinos o plasma seminal consiste em um fluido expelido em frações durante a ejaculação e sua composição apresenta diferentes aspectos bioquímicos de acordo com cada fração ejaculada. A primeira fração é a pré-espermática, aquosa, e provém das glândulas bulbouretrais e próstata e realiza a limpeza da uretra. A segunda fração é rica

em espermatozoides, leitosa, e é composta por secreções do epidídimo e da ampola do ducto deferente. A terceira fração apresenta poucos espermatozoides e grandes quantidades de ácido cítrico e gel proveniente das vesículas seminais, que arrastam os poucos espermatozoides que ainda restam na uretra (AMANN e GRAHAM, 1993).

2. Anatomia e fisiologia do epidídimo

O epidídimo é um órgão alongado e enovelado localizado na superfície dorsal do testículo, é anatomicamente subdividido em três segmentos; no segmento da cabeça o espermatozoide adquire capacidade de motilidade, no corpo a habilidade de fecundação, e no segmento final, a cauda, os espermatozoides são armazenados. As células epididimárias são especializadas em manter o ambiente para maturação espermática e realizar a proteção imunológica. Esta funcionalidade é baseada principalmente na manutenção de baixos níveis de metabólitos, prevenindo a ativação prematura dos espermatozoides (MARENGO, 2008).

Ao final do trânsito epididimário, os espermatozoides armazenados na cauda do epidídimo possuem capacidade de fertilização (PAPA et al., 2008; MONTEIRO et al., 2010). Durante a ejaculação esses espermatozoides deixam a cauda do epidídimo e fazem contato com as secreções das glândulas anexas, que constituem o plasma seminal (MAXWELL e JOHNSON, 2000).

3. Efeitos do plasma seminal sobre a viabilidade dos espermatozoides

O plasma seminal de garanhões pode conter quantidades diferentes de seus componentes, e essas proporções podem ser um fator determinante na capacidade dos espermatozoides em sobreviver à um processo que cause estresse celular, como a criopreservação (SKANDHAN et al., 1992).

Já são conhecidos alguns fatores que têm capacidade de interagir com a membrana plasmática/celular dos espermatozoides, os quais são de extrema importância no processo de fertilização (SKANDHAN et al., 1992).

O PS apresenta altas concentrações de sódio, íon que pode prejudicar a qualidade espermática, uma vez que altas concentrações de sódio e potássio podem induzir a peroxidação lipídica espontânea na membrana espermática (ALVAREZ e STOREY,

1982). O cálcio está envolvido na maturação, motilidade espermática e reação acrossomal. Já o magnésio atua como cofator em mais de 300 reações enzimáticas envolvidas no metabolismo energético e na síntese de ácidos nucleicos. O zinco possui atividade antioxidante e antibacteriana, além de desempenhar papel na motilidade e estabilização da membrana dos espermatozoides (BARRIER-BATTUT et al., 2002).

Embora diversas pesquisas sobre as características de vários componentes bioquímicos do PS tenham sido publicadas e o progresso tenha sido feito especialmente no campo da proteômica, seu papel fisiológico ainda não é totalmente compreendido nem para os espermatozoides nem no trato reprodutivo da fêmea. (KARESKOSKI e KATILA, 2008).

4. Efeito do plasma seminal sobre a criopreservação do sêmen

Mesmo sabendo da importância do plasma seminal, muitos procedimentos de criopreservação de sêmen são feitos com a sua remoção e substituição por meios diluentes, alegando-se que a remoção é necessária para uma maior sobrevivência dos espermatozoides criopreservados. Contudo vem sendo demonstrado que a manutenção de 20% do plasma seminal aumenta a porcentagem de espermatozoides móveis de garanhões criopreservados (Katila et al. 2002).

Sabe-se que a criopreservação do sêmen aumenta a produção de espécies reativas do oxigênio (ERO). A proteção contra a alta produção de ERO, e consequentemente a diminuição de danos celulares pela ação de antioxidantes presentes no plasma seminal é importante para a manutenção dos espermatozoides, uma vez que a baixa capacidade antioxidante presente no sêmen está correlacionada à baixa fertilidade (GUERRA et al., 2004).

Aurich et al. (1996) relataram que espermatozoides de garanhões que apresentavam motilidade pós-descongelção menor que 20% (baixa motilidade), tiveram uma maior motilidade quando PS de animais que apresentaram alta motilidade espermática foi utilizado durante a congelção, concluindo que essa secreção, de alguns animais, apresenta componentes que protegem a membrana dos espermatozoides, principalmente durante a criopreservação.

Adicionando o PS de garanhões com boa motilidade pós-descongelção ao sêmen de garanhões com baixa motilidade pós-descongelção, Brinsko et al. (2000) relataram

uma melhora significativa na motilidade pós-descongelção dos espermatozoides do grupo de garanhões com baixa motilidade.

Em frações ricas em espermatozoides, a motilidade pós-descongelção e integridade das membranas plasmática e acrossomal quando centrifugados são superiores, quando comparados as mesmas frações não centrifugadas e ejaculados totais centrifugados (SIEME et al., 2004).

Kareskoski et al. (2006) observaram que não houve diferença significativa na motilidade ou integridade da membrana plasmática entre as frações após 24 horas de armazenamento refrigerado em leite desnatado e plasma seminal com uma razão de sêmen: diluidor de 1: 1-3.

A interpretação de resultados de pesquisas com armazenamento de sêmen é um desafio. Variações nos resultados podem ser devido as diferenças no desenho do estudo e nos métodos utilizados. Fatores como composição do diluente, taxa de diluição, temperaturas, tempo de armazenamento e regimes de centrifugação afetam diretamente a sobrevivência espermática durante o processo. As técnicas de colheita de sêmen diferem e as definições de “frações ricas em espermatozoides” podem variar. Outros problemas incluem a variação de garanhões e frequentemente o número baixo de garanhões, o que permite um impacto considerável de um indivíduo talvez excepcional. Além disso, as variáveis de motilidade espermática são comumente usadas para avaliar a longevidade e a qualidade dos espermatozoides, embora seja relatado que a motilidade espermática após o armazenamento não se correlacione muito com a fertilidade (JASKO et al., 1992; KUISMA et al., 2006).

Neuhauser et al. (2015) demonstraram que uma maior estabilidade da membrana plasmática dos espermatozoides epididimários podem levar a uma maior resistência as lesões causadas pela congelação das células, e a adição do PS após a descongelção poderia ter uma influência positiva e ativadora no sêmen no trato genital feminino. A sua adição ao sêmen preservado imediatamente antes da inseminação pode ser benéfica por vários motivos, entre eles estão: modulação da resposta imunológica no trato genital da égua para proteger os espermatozoides além de aumentar a contração uterina, ajudando na eliminação de espermatozoides não viáveis (ALGHAMDI et al., 2005).

A adição de PS homólogo a espermatozoides da cauda do epidídimo de garanhões submetidos a congelação-descongelção, resultou em uma melhora da motilidade de forma dose dependente, independentemente da qualidade do sêmen dos garanhões doadores, podendo influenciar positivamente na fertilidade quando adicionado entre a

descongelamento e a inseminação. Outro ponto relevante é que parece haver uma concentração ideal de plasma que deve ser utilizada para melhorar a motilidade espermática (NEUHAUSER et al., 2015).

A adição ao meio de lavagem do epidídimo não melhorou a motilidade após a descongelamento dos espermatozoides epididimários em todos os ganhos. No entanto, uma melhora significativa da motilidade ocorre quando é adicionado após o processo de congelamento-descongelamento (NEUHAUSER et al., 2013).

Como o plasma seminal representa uma fonte natural de proteção das células espermáticas aos danos da criopreservação, supõe-se que sua presença proteja as células espermáticas por minimizar o estresse oxidativo, e também, melhore a capacidade de sobrevivência dessas células no trato genital da égua. A adição de PS, também evita a capacitação prematura e pode converter os espermatozoides capacitados de volta para um estado de decapacitação, o que pode permitir que espermatozoides criopreservados permaneçam férteis durante um intervalo mais longo (BEGLEY e QUINN, 1982).

Algumas pesquisas indicam que as éguas inseminadas com sêmen equino congelado podem desenvolver uma endometrite prolongada, sendo a remoção do PS uma das causas para esta reação, a qual leva a redução da fertilidade do sêmen equino criopreservado. Complementando essa ideia, estudos relatam uma diminuição no número de células inflamatórias polimorfonucleares recuperadas do útero das éguas após infusão com PS isolado ou em conjunto com espermatozoides, quando comparado com infusão de espermatozoides sem plasma seminal (TROEDSSON et al., 2001).

Segundo Troedsson et al. (2002), o PS suprime a ativação do sistema complemento, a quimiotaxia de polimorfonucleares e a fagocitose por neutrófilos *in vitro*, desempenhando, portanto, um papel no combate a endometrite pós cobertura.

Sabendo que espermatozóides equinos induzem uma resposta inflamatória uterina caracterizada por um influxo rápido e transitório de polimorfonucleares Doty et al. (2011) concluíram que a proteína CRISP3 no plasma seminal modula a remoção dos espermatozoides nos órgãos genitais feminino, suprimindo e regulando essa ligação de polimorfonucleares aos espermatozoides.

Neuhauser et al. (2013) em estudo feito com espermatozoides recuperados do epidídimo, demonstraram que a suplementação com plasma seminal superou a motilidade total e a motilidade progressiva do sêmen ejaculado do mesmo ganho doador.

Em estudo semelhante Heise et al. (2010) relatam aumento da taxa de prenhez após a inseminação artificial com espermatozoides epididimários frescos e congelados que foram expostos ao PS em comparação com a inseminação artificial com espermatozoides epididimários sem a exposição. Além disso, a taxa de prenhez obtida com os espermatozoides do epidídimo fresco e congelado que entraram em contato com o plasma seminal foi semelhante àquela após o uso de espermatozoides ejaculados, indicando que a exposição dos espermatozoides epididimários ao plasma seminal antes de qualquer outra diluição aumenta a fertilidade de garanhões.

Em um trabalho realizado com a recuperação de espermatozoides do epidídimo, Neuhauser et al. (2013), relataram que a adição de plasma seminal aumentou a motilidade dos espermatozoides após descongelação independente do segmento epididimário investigado. No entanto, as amostras que receberam essa adição apresentaram menor motilidade que aquelas que utilizou-se o diluente com leite desnatado para o processo de congelamento. O plasma seminal influencia de forma positiva o movimento dos espermatozoides, no entanto, afeta negativamente o processo de armazenamento artificial, resfriamento e criopreservação, de uma maneira dependente da dose (MORRELL et al., 2012).

Tiplady et al. (2002), relataram que a adição de PS ao meio utilizado para recuperar os espermatozoides da cauda do epidídimo de garanhão, melhora a motilidade total e progressiva inicial, no entanto, seis horas mais tarde, a motilidade não foi significativamente melhor quando comparada ao grupo sem exposição do plasma seminal.

A presença do plasma seminal para alguns garanhões parece ser necessária para a criopreservação do sêmen e fertilidade, por outro lado a remoção da sua maior parte por centrifugação antes do processo é benéfica para outros garanhões cujo ejaculado tenha baixa tolerância a criopreservação (BRINSKO et al., 2000).

5. Tuba uterina e o reservatório espermático

A tuba uterina é uma estrutura tubular, de natureza predominantemente muscular que liga os ovários aos cornos uterinos. O fluido produzido por ela é rico em proteínas importantes para os espermatozoides executarem a fecundação, além de terem influência no armazenamento, transporte e capacitação espermática (HAFEZ, 2004), bem como promove um ambiente favorável para maturação oocitária, fertilização e desenvolvimento

inicial do embrião (HUNTER, 2005).

Ela pode ser dividida em três segmentos: infundíbulo, região mais próxima ao ovário com formato de funil; composto por fimbrias que ajudam na captação do oócito. Ampola, região média; proporciona um ambiente adequado a fertilização e o desenvolvimento embrionário inicial. E o istmo, região mais próxima ao útero; que tem como a principal função o armazenamento espermático (YÁNIZ et al., 2000). Entre elas existem as áreas de transição, sendo as mais conhecidas a junção útero-tubárica; união entre o útero e o istmo e a junção istmo-ampolar, local onde acontece a fecundação (HOLT e FAZELI, 2015).

Uma das principais funções da tuba uterina é a formação do reservatório espermático, principalmente no istmo, protegendo os espermatozoides pela diminuição da motilidade e capacitação (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2005), prolongando a viabilidade e a função espermática por meio da supressão de níveis altos de cálcio intracelular.

Karre et al. (2012) relataram que, somente 10 % dos espermatozoides de cães que entram no trato reprodutivo feminino têm a capacidade de entrar na tuba e se ligar ao epitélio para formação do reservatório espermático. Esta ligação reconhece e seleciona uma população de espermatozoides férteis com acrossoma intacto, ou seja, aqueles sem reação acrossomal (TEJEIRO e MARINI, 2012).

Depois de entrar na tuba uterina, durante o período peri-ovulatório, os espermatozoides se ligam ao epitélio para estabelecer um reservatório no istmo caudal e na junção útero-tubárica (BOYLE et al., 1987). Na égua, os espermatozoides no reservatório podem precisar sobreviver por períodos relativamente longos, dada a duração prolongada do cio, ressaltando assim a importância da formação do reservatório nessa espécie. Acredita-se que a interação entre as células epiteliais da tuba uterina e os espermatozoides tem vários objetivos: fornecer um ambiente adequado para armazenamento e sobrevivência espermática até a ovulação; selecionar uma população espermática viável quanto a morfologia e motilidade; preparar espermatozoides para capacitar e adquirir a capacidade de fertilizar o oócito maduro e evitar poliespermia (SUAREZ 2002).

6. Efeito do PS sobre a ligação dos espermatozoides às células da tuba uterina

A ligação dos espermatozoides equinos com a tuba uterina parece ser complexa, envolvendo ligação à lectina e cálcio; a natureza da interação não é totalmente esclarecida. Sabe-se que eventos relacionados à capacitação espermática estão relacionando a uma liberação regular de espermatozoides da tuba uterina e a maioria dos achados sugere que a exposição às secreções desse epitélio desencadeia a capacitação espermática *in vivo*. Outro aspecto relevante da fisiologia da tuba para a interação e capacitação, é o equilíbrio ácido-base. Embora essas interações tenham sido estudadas extensivamente em muitos mamíferos, há poucos dados disponíveis para equinos, em parte devido à escassez de tecidos reprodutivos equinos disponíveis para os estudos (LEEMANS et al., 2016).

Na tuba uterina de mamíferos, proteínas presentes na membrana plasmática externa dos espermatozoides não capacitados, reconhecem porções de carboidratos na superfície da membrana plasmática de células epiteliais da tuba uterina (SUAREZ 2002, SOSTARIC et al., 2005). Em equinos, foi relatado que tanto a proteína fetuín quanto a asialofetuín bloqueiam a ligação do espermatozoide *in vitro*, o último fazendo isso de forma mais potente. Quando o ácido siálico é removido da fetuína, a D-galactose é o principal carboidrato exposto no final das cadeias de oligossacarídeos (LEFEBVRE et al., 1995).

A proteína que se liga a galactose foi detectada na superfície de espermatozoides de garanhão e também foi demonstrado que galactosil são altamente expressos no ístimo equino (SABEUR e BALL 2007), sugerindo o seu envolvimento como ligadores para a adesão dos espermatozoides.

No equino uma das principais proteínas do plasma seminal associada à membrana plasmática do espermatozoide é a HSP-7. Esta proteína é homóloga equina da espermadesina suína (TOPFER-PETERSEN et al., 2005). A HSP-7 interage com carboidratos expressos no epitélio da tuba uterina e pode ser uma das envolvidas na formação de reservatórios espermático. A SP-1 e SP-2, anteriormente HSP-1 e HSP-2, que são membros da família de proteínas fibronectina-2, também foram identificados no plasma seminal equino e são envolvidas no estabelecimento do reservatório espermático da tuba uterina (EKHLASI-HUNDRIESER et al., 2005). No entanto, o papel das HSPs na formação do reservatório espermático da tuba uterina não foi completamente elucidado.

A presença de fucose foi identificada em receptores conhecidos como anexinas. Quatro anexinas são conhecidas; ANXA1, ANXA2, ANXA3 E ANXA5, todas presentes na superfície apical da mucosa do epitélio da tuba, especificamente nos cílios (IGNOTZ et al., 2007). Outra molécula que interage na formação do reservatório é a osteopontina, glicoproteína envolvida com a adesão celular, fertilização e desenvolvimento.

Para se desligar do epitélio da tuba uterina, acredita-se que os espermatozoides tenham que sofrer capacitação. A este respeito, espermatozoides de garanhão co-cultivados com explantes de células epiteliais da tuba uterina mostraram sinais de capacitação, enquanto os cultivados em condições semelhantes mas sem células da tuba uterina não (LEEMANS et al., 2014).

Por outro lado, após exposição prévia ao ionóforo de cálcio, significativamente menos espermatozoides de garanhão são capazes de se ligar a monocamadas de células da tuba uterina. Além disso, o estradiol e heparina têm sido relatados como agentes que provocam o desligamento de espermatozoides a partir de monocamadas de células epiteliais da tuba uterina (THOMAS et al., 1995).

Outra hipótese é que a mistura de secreções da tuba uterina e componentes do fluido folicular deve induzir a capacitação espermática no período peri-ovulatório equino, pois observou-se que o efeito combinado de pH elevado, cálcio externo e fluido folicular foi responsável pela fosforilação da proteína tirosina, hiperativação e liberação dos espermatozoides do epitélio da tuba uterina (LEEMANS et al., 2015).

In vivo, a ligação espermática na tuba uterina no período anterior a ovulação, é um evento essencial no processo de capacitação que prepara espermatozoides para fertilização. Uma característica importante da capacitação espermática é a fosforilação da proteína tirosina que, em muitas espécies, pode ser facilmente induzida *in vitro*, expondo os espermatozoides a uma combinação de cálcio e outras substâncias, mas que nos equinos não há essa facilidade de reproduzir tal fenômeno (SUAREZ, 1998).

Usando o modelo de explante da tuba uterina, Leemans et al. (2014), demonstraram que a ligação *in vitro* de espermatozoides de garanhões ao epitélio foi capaz de induzir a capacitação.

O número de espermatozoides que se ligaram ao explante em co-cultura, apresenta correlação positiva entre as taxas de fertilidade, o tempo de sobrevivência do espermatozoide ligado ao explante foi mais longo para os espermatozoides do grupo de garanhões com maior fertilidade em comparação com o grupo médio, mostrando que

fatores relacionados a capacidade de ligação estão associados diretamente com a fertilidade (ELLINGTON et al.,1999).

Objetivos

Avaliar a cinética e ligação às células epiteliais da tuba uterina dos espermatozoides recuperados da cauda do epididimo com adição de plasma seminal.

Comparar a cinética e ligação as células epiteliais da tuba uterina dos espermatozoides recuperados da cauda do epididimo com adição de plasma seminal de garanhão com alta fertilidade e capacidade de refrigeração, com de garanhão com baixa fertilidade e capacidade de refrigeração.

REFERÊNCIAS

- ALGHAMDI, A. S.; MADILL, S.; FOSTER, D. N. Seminal plasma improves fertility of frozen equine semen. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p. 242-245, 2005.
- ALVAREZ, J. G.; STOREY, B.T. Spontaneous lipid peroxidation in rabbit epididymal spermatozoa: its effect on sperm motility. **Biology of Reproduction**, v. 27, p. 1102-8, 1982.
- AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoal function. In: **McKINNON, A.O.; VOSS, J.L. Equine reproduction**. Philadelphia: Saunders, 1993. p. 715-745.
- AURICH, J. E.; KUHNE, A.; HOPPE, H.; AURICH, C. Seminal plasma effects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. **Theriogenology**, v. 46, p. 791-797, 1996.
- BARKER, C. A.; GANDIER, S. C. C. Pregnancy in a mare resulting from frozen epididymal spermatozoa. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 21, n. 2, p. 47-51, 1957.
- BARRIER-BATTUT, I.; DELAJARRAUD, H.; LEGRAND, E.; BRUYAS, J. F.; TAINURIER, D.; THORIN, C.; POULIQUEN, H. Calcium, magnesium, copper and zinc in seminal plasma of fertile stallions, and their relationship with semen freezability. **Theriogenology**, v. 58, p. 229-232, 2002.
- BEGLEY, A. J.; QUINN, P. Decapacitation factors in semen. **Clinical Reproduction and Fertility**, v. 1, p. 167-75, 1982.
- BOYLE, M. S.; CRAN, D. G.; ALLEN, W. R.; HUNTER, R. H. Distribution of spermatozoa in the mare's oviduct. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 35 p. 79-86, 1987.
- BOUÉ, F.; BLAIS, J.; SULLIVAN, R. Surface localization of P34H, an epididymal protein, during maturation, capacitation, and acrosome reaction of human spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 54, p. 1009-1017, 1996.
- BRINSKO, S. P.; CROCKETT, E. C.; SQUIRES, E. L. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. **Theriogenology**, v. 54, p. 129-136, 2000.
- DE PAUW, I. M. C.; VAN SOOM, A.; LAESENS, H.; VERBERCKMOES, S.; DE KRUIF, A. Sperm binding to epithelial explants in bulls with different non-return rates investigated with a new in vitro model. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 1073-1079, 2002.

- DOTY, A.; BUHL, W. C.; BENSON, S.; SCOGGIN, K. E.; POZOR, M.; MACPHERSON, M.; MUTZ, M.; TROEDSSON, M. H. T. Equine CRISP3 modulates interaction between spermatozoa and polymorphonuclear neutrophils. **Biology of reproduction**, v. 85, n. 1, p. 157-164, 2011.
- EKHLASI-HUNDRIESER, M.; SCHAFER, B.; KIRCHHOFF, C.; HESS, O.; BELLAIR, S.; MULLER, P.; TOPFER-PETERSEN, E. Structural and molecular characterization of equine sperm-binding fibronectin-II module proteins. **Molecular Reproduction and Development**, v. 70, p. 45-57, 2005.
- ELLINGTON, J. E.; SAMPER, J. C.; JONES, A. E.; OLIVER, S. A.; BURNETT, K. M.; WRIGHT, R. W. In vitro interactions of cryopreserved stallion spermatozoa and oviduct uterine tube/ epithelial cells or their secretory products. **Animal Reproduction Science**, v. 56, p. 51-65, 1999.
- GUERRA, M. M. P.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Papel de antioxidantes na andrologia (Revisão de Literatura). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 28, n. 4, p. 187-195, 2004.
- HAFEZ, B.; HAFEZ E., S. E. **Reprodução Animal**. 7 edn., São Paulo: Manole. 2004.
- HEISE, A.; KÄHN, W.; VOLKMANN, D. H.; THOMPSON, P. N.; GERBER, D. Influence of seminal plasma on fertility of fresh and frozen-thawed stallion epididymal spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 118, p. 48–53, 2010.
- HOLT, W. V.; FAZELI, A. Sperm selection in the female mammalian reproductive tract. Focus on the oviduct: hypotheses, mechanisms, and new opportunities. **Theriogenology**, v. 85, n. 1, p. 105-112, 2015.
- HUNTER, R. H. F. The Fallopian tubes in domestic mammals: how vital is their physiological activity?. **Reproduction Nutrition Development**, v. 45, n. 3, p. 281-290, 2005
- IGNOTZ, G. G.; CHO, M. Y.; SUAREZ, S. S.; Annexins are candidate oviductal receptors for bovine sperm surface proteins and thus may serve to hold bovine sperm in the oviductal reservoir. **Biology of Reproduction**, v. 77, p. 906-913, 2007.
- JASKO, D. J.; LITTLE, T. V.; LEIN, D. H.; FOOTE, R. H. Comparison of spermatozoa movement and semen characteristics with fertility in stallions: 64 cases (1987–1988). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, p. 979-985, 1992.
- KARESKOSKI, A. M.; REILAS, T.; ANDERSSON, M.; KATILA, T. Motility and plasma membrane integrity of spermatozoa in fractionated stallion ejaculates after storage. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, p. 33-38, 2006a.

- KARESKOSKI, M.; KATILA, T. Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. **Animal Reproduction Science**, v. 107, p. 249-256, 2008.
- KARRE, I.; MEYER-LINDENBERG, A.; URHAUSEN, C.; BEINEKE, A.; MEINECKE, B.; PIECHOTTA, M.; BEYERBACH, M.; APEL, A. R. G. Distribution and viability of spermatozoa in the canine female genital tract during post-ovulatory oocyte maturation. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 54, n. 1, p. 49, 2012.
- KATILA, T.; ANDERSON, M.; REILAS, T.; KOSKINEN, E. Post-thaw motility and viability of fractionated and frozen stallion ejaculates. **Theriogenology**, v. 58, p. 241-244, 2002.
- KUISMA, P.; ANDERSSON, M.; KOSKINEN, E.; KATILA, T. Fertility of frozen-thawed stallion semen cannot be predicted by the currently used laboratory methods. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 48, p. 14, 2006.
- LEEMANS, B.; GADELLA, B. M.; SOSTARIC, E.; NELIS, H.; STOUT, T. A.; HOOGEWIJS, M.; VAN SOOM, A. Oviduct binding and elevated environmental pH induce protein tyrosine phosphorylation in stallion spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 91, p. 1-13, 2014.
- LEEMANS, B.; GADELLA, B. M.; STOUT, T. A.; NELIS, H.; HOOGEWIJS, M.; VAN SOOM, A. An alkaline follicular fluid fraction induces capacitation and limited release of oviduct epithelium-bound stallion sperm. **Reproduction**, v. 150, p. 193-208, 2015.
- LEEMANS, B.; GADELLA, B. M.; STOUT, T. A.; DE; SCHAUWER, C.; NELIS, H.; HOOGEWIJS, M.; VAN SOOM, A. Why doesn't conventional IVF work in the horse? The equine oviduct as a microenvironment for capacitation/fertilization. **Reproduction**, v. 152(6), p. 233-245, 2016.
- LEFEBVRE, R.; DEMOTT, R.; SUAREZ, S.; SAMPER, J. Specific inhibition of equine sperm binding to oviductal epithelium. In **Equine Reproduction VI, Biology of Reproduction Monograph**, v. 1, p. 689-696, 1995.
- MARENGO, S. R. Maturing the sperm: Unique mechanisms for modifying integral proteins in the sperm plasma membrane. **Animal Reproduction Science**, v. 105, p. 52-63, 2008.
- MAXWELL, W. M. C.; JOHNSON, L. A. Physiology of spermatozoa of a dilution rates: the influence of seminal plasma. **Theriogenology**, v. 52, p. 1273-1280, 2000.
- MONTEIRO, G. A.; GUASTI, P. N.; MELO, C. M.; DELLAQUA JUNIOR, J. A.; MARTIN, J. C.; CARNEIRO, R. Comparison between cooled sperm from ejaculate and

epididymal cauda. **In: Proceedings of the 11th Congress of World Equine Veterinary Association**, Guaruja: WEVA; p. 296, 2010.

MORRELL, J. M.; PIHL J.; DALIN A-M.; JOHANNISSON, A. Restoration of seminal plasma to stallion spermatozoa selected by colloid centrifugation increases sperm progressive motility but is detrimental to chromatin integrity. **Theriogenology**, v. 78, p. 345-352, 2012.

NEUHAUSER, S.; DÖRFEL, S.; HANDLER, J. Dose-dependent effects of homologous seminal plasma on motility and kinematic characteristics of post-thaw stallion epididymal spermatozoa. **Andrology**, v. 3, p. 536-543, 2015.

NEUHAUSER, S.; RHEINFELD, S.; HANDLER, J. Motility of Fresh and Frozen Thawed Stallion Sperm from Three Segments of the Epididymal Cauda and the Effect of Post-Thaw Seminal Plasma Addition on Motility. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, p. 942-949, 2013.

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

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; SARAVIA, F.; WALLGREN, M. Boar spermatozoa in the oviduct. **Theriogenology**, v. 63, n. 2, p. 514-535, 2005.

SABEUR, K.; BALL, B. A. Characterization of galactose-binding proteins in equine testis and spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 101, p. 74-84, 2007.

SIEME, H.; KATILA, T.; KLUG, E. Effect of semen collection practices on sperm characteristics before and after storage and on fertility of stallions. **Theriogenology**, v. 61, p. 769-784, 2004.

SOSTARIC, E.; VAN DE LEST, C. H.; COLENBRANDER, B.; GADELLA, B. M. Dynamics of carbohydrate affinities at the cell surface of capacitating bovine sperm cells. **Biology of Reproduction**, v. 72, p. 346-357, 2005.

SKANDHAN, K. P. Review on copper in male reproduction and contraception. **Revue française de gynécologie et d'obstétrique**, v. 87, p. 594-598, 1992.

SUAREZ, S. S. The oviductal sperm reservoir in mammals: mechanisms of formation. **Biology of Reproduction**, v. 58(5), p. 1105-1107, 1998.

SUAREZ, S. S. Formation of a reservoir of sperm in the oviduct. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 37, p. 140-143, 2002.

SUAREZ, S. S. Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct. **International Journal of Developmental Biology**, v. 52, p. 455-462, 2008.

- TEIJEIRO, J. M.; MARINI, P. E. The effect of oviductal deleted in malignant brain tumor 1 over porcine sperm is mediated by a signal transduction pathway that involves pro - AKAP4 phosphorylation. **Reproduction**, v. 143, p. 773-785, 2012.
- THOMAS, P. G. A.; BALL, B.; BRINSKO, S. Changes associated with induced capacitation influence the interaction between equine spermatozoa and oviduct epithelial cell monolayers. **Biology of Reproduction Monograph**, v.1, p. 697-705, 1995.
- 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, n. 2, p. 225-228, 2002.
- TOPFER-PETERSEN, E.; EKHLASI-HUNDRIESER, M.; KIRCHHOFF, C.; LEEB T.; SIEME, H. The role of stallion seminal proteins in fertilisation. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p. 159-170, 2005.
- TROEDSSON, M. H. T.; ALGHAMDI, A. S.; MATTISEN, J. Equine seminal plasma protects the fertility of spermatozoa in an inflamed uterine environment. **Theriogenology**, v. 58, p. 453-456, 2002.
- TROEDSSON, M. H. T.; LOSET, K.; ALGHAMDI, A. M.; DAHMS, B.; CRABO, B. G. Interaction between equine semen and the endometrium: the inflammatory response to semen. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 273-8, 2001.
- YÁÑIZ, J. L.; LOPEZ-GATIUS, F.; SANTOLARIA, P.; MULLINS, K. J. Study of the functional anatomy of bovine oviductal mucosa. **The Anatomical Record**, v. 260, p. 268-278, 2000.

CAPÍTULO 2

ARTIGO

Artigo redigido segundo as normas da Theriogenology, ISSN: 0093-691X, ranqueada como A2 pelo QUALIS-CAPES de 2017

<https://www.journals.elsevier.com/theriogenology>

Efeito da adição de meio diluidor e do plasma seminal sobre a cinética e ligação dos espermatozoides do epidídimo equino as células da tuba uterina

Canuto, L. E. F^A, Papa, F.O^A...

^A Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil.

Autor correspondente Tel.: +55 16 98151-5587
E-mail: lucas.canuto@hotmail.com

Resumo

No equino a ligação dos espermatozoides ao reservatório espermático da tuba uterina parece ser mais complexa do que em outras espécies; essa interação não está totalmente compreendida. No entanto sabe-se que existem proteínas do plasma seminal que estão relacionadas a capacitação, ligação e liberação dos espermatozoides no epitélio da tuba uterina; e a recuperação de espermatozoides da cauda do epidídimo não recebe plasma seminal. Nesse sentido os objetivos do estudo foram: Avaliar a taxa de ligação de espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo aos explantes de tuba uterina e comparar a cinética de espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo após adição de plasma seminal. Foram avaliados 4 grupos, LD apenas com diluente a base de leite desnatado, GO recebeu adição de diluente para congelação a base de gema de ovo, PSB plasma seminal de garanhão com alta fertilidade e capacidade de refrigeração, e PSR plasma seminal de garanhão com fertilidade e capacidade de refrigeração inferiores. Os grupos LD, GO, PSB apresentaram valores crescentes de motilidade total, motilidade progressiva e espermatozoides rápidos, já o PSR diferiu do LD mas apresentou valores semelhantes ao GO e PSB. Quanto a taxa de ligação dos espermatozoides do epidídimo aos explantes não foi observada diferença estatística entre os grupos tratados, no entanto foi observado alto número de espermatozoides ligado por área quando comparado a outras pesquisas, provavelmente pela seleção das tubas uterinas de animais com ausência de corpo lúteo.

Palavras-chave: garanhão, recuperação de espermatozoides, reservatório espermático, sêmen, capacitação

1. Introdução

Processos que impossibilitam a colheita de sêmen ou acasalamento de um garanhão podem ocorrer, e quando ocorrem é grave, pois interrompem precocemente a reprodução equina. A reprodução de garanhões com alto valor zootécnico pode cessar de forma abrupta e prematura. O óbito acidental, eutanásia, processos obstrutivos ou castração terapêutica são os principais eventos que interrompem a reprodução do garanhão. Nestes casos é cada vez mais importante a realização da última colheita de material genético para armazenar e perpetuar o banco de germoplasma desses garanhões, sendo o resgate de espermatozoides do epidídimo a principal alternativa.

A técnica de recuperação de espermatozoides da cauda do epidídimo é considerada eficiente na recuperação espermática, podendo ser utilizada tanto para armazenamento do espermatozoide resfriado quanto para congelado. As taxas de fertilidade são semelhantes quando comparado espermatozoides colhidos por meio da vagina artificial (MONTEIRO et al., 2011).

Mas acredita-se que na técnica tradicional os espermatozoides recuperados apresentam menor capacidade de ligação e armazenamento na tuba uterina o que foi demonstrado por (CARNEIRO et al., 2017).

Espermatozoides recuperados do epidídimo não incorporam as proteínas, enzimas e lipídios do plasma seminal (PS), pois não entram em contato com o mesmo. O PS, entre outras funções apresenta a capacidade de modular a resposta imunológica do trato genital feminino, maturação do espermatozoide pós-testicular, ativação e estabelecimento do reservatório espermático (CABALLERO et al., 2012). O reservatório espermático da fêmea está localizado no trato genital feminino, especificamente no istmo caudal da tuba uterina (BADER, 1982; SCOTT et al., 1995). No equino, suas funções ainda não estão

67 completamente elucidadas mas sabe-se que o armazenamento dos espermatozoides
68 previne a capacitação precoce e aumenta seu tempo de vida útil (THOMAS et al., 1994).

69 Após a ejaculação os espermatozoides percorrem o útero e alcançam as tubas
70 uterinas, onde formam o reservatório espermático. Em bovinos o reservatório é formado
71 pela ligação dos espermatozoides aos glicoconjugados contendo fucose na superfície das
72 células da tuba uterina. Gwathmey et al., (2003-2006) demonstraram nesta espécie que a
73 proteína PDC-109, que está em grande quantidade no plasma seminal bovino, pertencente
74 à família das BSPs, e interagem com os espermatozoides na ejaculação, especificamente
75 na membrana plasmática. Esta proteína além, de promover nos espermatozoides a
76 capacidade de ligação ao reservatório, desempenham um papel crucial na fertilização,
77 aumentando e mantendo a motilidade progressiva por mais tempo quando comparado
78 com a incubação de espermatozoides na sua ausência. De igual forma, observaram
79 também que os espermatozoides perderam a capacidade de se ligar ao epitélio da tuba
80 uterina após a capacitação induzida por heparina, mas o tratamento com a PDC-109
81 restaurou essa função.

82 Comparando a taxa de ligação aos explantes da tuba uterina de espermatozoides
83 da cauda do epidídimo com os do ejaculado, foi possível observar que os recuperados do
84 epidídimo apresentaram menor ligação, e no mesmo estudo concluíram que após o
85 primeiro contato com o plasma seminal mesmo após a centrifugação e congelação a
86 capacidade de ligação foi preservada (CARNEIRO et al., 2017).

87 Nesse sentido o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da adição de: dois
88 diferentes plasmas seminal homólogos, sendo um de alta qualidade e outro de qualidade
89 inferior, meio diluente a base de leite desnatado e meio diluente a base de gema de ovo
90 em espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo sobre a cinética e ligação as
91 células epiteliais da tuba uterina.

2. Materiais e métodos

Este projeto foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) – Campus de Botucatu, São Paulo, sob protocolo CEUA 0113/2018.

2.1. Animais e local da pesquisa

Os epidídimos foram extraídos de 8 garanhões da raça Mini-horse, que apresentaram motilidade total $\geq 40\%$, tendo entre 3 -7 anos. Para obtenção do plasma seminal foram utilizados ejaculados de dois garanhões, um da raça Mangalarga Marchador e um Hanoveriano, sendo um de alta fertilidade e capacidade de refrigeração (80% de fertilidade e $80\% \geq$ de motilidade total após 24 horas de refrigeração) e outro de baixa fertilidade e capacidade de refrigeração (50% de fertilidade e $60\% \leq$ de motilidade total após 24 horas de refrigeração), essa classificação foi adaptada de Hartwig et al.,2014.

Os animais foram mantidos em piquete e receberam feno de Cost-cross (Cynodon dactylon) e concentrado comercial duas vezes ao dia e tiveram acesso a água e sal mineral *ad libitum*.

2.2. Orquiectomia

Foi realizado orquiectomia bilateral com os animais em estação, utilizando 0,5 mg/kg/i.v de cloridrato de xilazina 10% (Sedomin®, König, Santana de Parnaíba, São Paulo - Brasil), associado a 0,05 mg/kg/i.v de cloridrato de acepromazina (Acepran®, Vetnil, Louveira, São Paulo - Brasil) para a sedação. Após 15 minutos da administração dos sedativos, foi realizada a antissepsia da região escrotal com polivinil pirrolidona iodo, em seguida duas incisões de aproximadamente 6cm paralelas à rafe mediana escrotal. Os testículos foram expostos pela incisão da túnica dartos e da túnica vaginal parietal, tracionados e em seguida efetuada uma incisão e hemostasia do funículo com o auxílio

118 de um emasculador. Os testículos foram identificados, a extremidade do ducto deferente
119 e o plexo pampiniforme ligados com fio de algodão para evitar extravasamento de
120 espermatozoides e sangue respectivamente, acondicionados em solução de Ringer com
121 lactato de sódio e transportados até o laboratório para processamento.

122 *2.3. Delineamento experimental*

123 O material colhido da cauda do epidídimo foi dividido em quatro alíquotas de igual
124 volume ou concentração, formando 4 grupos experimentais : Grupo leite desnatado (LD),
125 grupo controle em que os espermatozoides receberam diluente a base de leite desnatado,
126 Grupo gema de ovo (GO) recebeu diluente de congelação Botu-Crio® (Botupharma,
127 Botucatu, São Paulo – Brasil), Grupo plasma seminal bom (PSB) plasma seminal de um
128 animal que apresenta alta fertilidade e resistência a refrigeração e Grupo plasma seminal
129 ruim (PSR) plasma seminal com fertilidade e capacidade de refrigeração inferiores. Para
130 cada grupo foi adicionado 50% do volume total de cada solução correspondente e cada
131 animal participou dos quatro grupos.

132

133 *2.4. Processamento das amostras*

134 *2.4.1. Epidídimo*

135 Após a chegada dos testículos, os epidídimos foram dissecados. Utilizou-se a técnica
136 de fluxo retrógrado adaptado da técnica descrita por Monteiro et al., 2011. Os
137 espermatozoides foram recuperados em diluente a base de leite desnatado (Botu-
138 Semen®), foi utilizado 2 ml de meio diluidor para a lavagem ducto deferente e cauda do
139 epidídimo, posteriormente utilizou-se 5 ml de ar com a mesma seringa para esvaziar o
140 ducto, uma alíquota de 10 µl foi destinada a concentração espermática.

141 2.4.2. *Plasma seminal*

142 O plasma seminal foi adquirido após colheita do ejaculados de cada garanhão com
143 vagina artificial modelo Botucatu. Após a colheita, o sêmen foi filtrado, na qual sujidades
144 e a fração gel foi removida. Posteriormente as amostras foram centrifugadas à 650 g
145 durante 15 minutos, o sobrenadante foi centrifugado novamente a 10.000 g durante 10
146 minutos a 4 °C, e o sobrenadante passou por filtro de 0,22 µm para obter maior purificação
147 da amostra, após filtrado foi armazenado em microtubos de 1,5mL e mantidos a -20 °C
148 até sua utilização.

149 2.4.3. *Colheita e cultura de células da tuba uterina*

150 Foram utilizadas tubas uterinas de vacas da raça nelore, com presença de folículos
151 antrais e ausência de corpo lúteo e não prenhas. As tubas uterinas foram, colocadas em
152 tubos falcon com solução DPBS (solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco)
153 acrescida 3% v/v de penicilina estreptomicina (PenStrep15140122, GYBCO® life by
154 Technologies, São Paulo, Brasil) e 2,4% v/v de anfotericina B (fungizone15290018,
155 GYBCO® life by Technologies, São Paulo, Brasil), e transportados em caixa isotérmica
156 a 4 °C ao laboratório.

157 No laboratório, as tubas foram lavadas com a solução DPBS com antibiótico e em
158 seguida os ligamentos e vasos sanguíneos foram removidos. As tubas foram separadas
159 desde a junção útero tubárica (JUT) até aproximadamente 1cm da ampola. Um cateter de
160 22G (0,9x25mm) acoplado a uma seringa contendo 2 ml de DPBS foi inserido na tuba
161 uterina e lavada até obter o conteúdo. Após obtenção do fluido, a amostra foi centrifugada
162 (600g durante 10 minutos) e lavada duas vezes com 5ml de DPBS.

163 O sobrenadante foi desprezado e o pellet transferido para uma placa de Petri (60 mm)
164 contendo 20 mL de uma solução composta por 90% v/v TCM199 sem HEPES,
165 suplementado com 10% v/v de soro fetal bovino (SFB), 1,5% v/v de penicilina/

166 estreptomicina e 1,2% v/v de anfotericina B, previamente estabilizada em estufa com
167 humidade relativa, 5% de CO₂ e 38,5 C°. As células da tuba uterina foram incubadas e
168 após 24 horas de cultivo, as placas foram avaliadas e os grupos de células que formaram
169 agregados coesos de formato tubular (explantes) e movimento devido ao batimento ciliar,
170 selecionadas.

171 *2.5. Avaliação espermática*

172 *2.5.1. Cinética espermática*

173 Uma amostra de cada grupo foi diluída em meio a base de leite desnatado, até atingir
174 a concentração de 50×10^6 espermatozoides/mL. A cinética espermática foi avaliada pelo
175 método computadorizado CASA (Hamilton Thorne Research - HTM IVOS 10, Beverly,
176 MA, USA), onde em cada amostra foram selecionados 5 campos aleatórios para os
177 seguintes parâmetros: porcentagens de espermatozoides com motilidade total (MT %),
178 motilidade progressiva (MP%) e de espermatozoides rápidos (RAP%). O setup utilizado
179 no CASA foi o mesmo descrito por Guasti et al. (2013).

180 *2.5.2. Análise da integridade de membrana plasmática*

181 A análise de integridade de membrana plasmática (IMP) dos espermatozoides foi
182 realizada pela técnica de microscopia de epifluorescência (Leica Microsysem – DMLB,
183 Ernst-Leitz-Strabe, Wezlar, Germany), utilizando-se a associação das sondas
184 fluorescentes diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e iodeto de propídio (IP) segundo
185 metodologia previamente utilizada por Hartwig et al., 2014. Nessa análise, 100 células
186 foram contadas, sendo os espermatozoides corados integralmente em verde considerados
187 íntegros e os espermatozoides corados em vermelho ou em verde e vermelho,
188 considerados lesados

189

2.6. *Teste in vitro de ligação dos espermatozoides aos explantes*

Inicialmente, as amostras foram incubadas por 10 minutos com seu respectivo diluente ou plasma, os grupos foram encaminhados para realizar o teste de ligação. As amostras foram transferidas para placas de petri previamente montadas com os explantes, e incubadas por 30 min. Cada placa de petri continha 4 gotas compostas por 60 μ L de meio sperm, suplementado com 22 μ g/mL pyruvate e 50 μ g/mL gentamicin, cobertas por óleo mineral, 15 explantes e 1×10^6 espermatozoides/mL. As placas foram incubadas a 37.5° C, 5% CO₂ em ar e 100% de umidade até serem avaliadas.

Após a incubação, os complexos explantes espermatozoides foram lavados mediante pipetagem em meio TALP sperm para eliminar os espermatozoides que não foram ligados aos explantes e transferidos para uma lâmina para captura das imagens. Para cada complexo explante espermatozoide cinco imagens foram obtidas em diferentes profundidades, devido o formato tridimensional do explante. As imagens foram adquiridas (20x magnitude) usando um microscópio invertido (Leica® DMI3000B Heidelberg, Germany) com câmera digital acoplada. O número de espermatozoides ligados e o perímetro de cada explante, foi avaliado utilizando o software de edição de imagens ImageJ (National Institutes of Health, USA). Esses parâmetros foram utilizados para calcular o número de espermatozoides ligados por milímetro quadrado (mm²) de explantes, obtido por: número de espermatozoide/ área de explante.

2.7. *Análise Estatística*

A distribuição das variáveis foi avaliada utilizando testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e análises gráficas (histograma e gráficos quantil-quantil). Os dados que não apresentaram normalidade, foram transformados. A análise de variância para medidas repetidas seguida por Tukey foi utilizada para confrontar as médias das diferentes variáveis dentro de cada tratamento e momento. Foram consideradas diferenças

estatísticas quando $p < 0,05$. O Statistical Analysis Software – SAS versão 9.3 (SAS Institute, 2011) foi utilizado para realizar os cálculos estatísticos.

3. Resultados

Nos oito animais estudados a média do número de espermatozoides coletados por cada cauda de epidídimo foi de 333.7 milhões, e 667.4 milhões a média do número de espermatozoides dos dois epidídimos por animal. O valor de menor e maior colheita por animal foi respectivamente 218 milhões e 1.494 bilhões de espermatozoides.

Os espermatozoides das diferentes amostras foram avaliados quanto à motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), porcentagem de células rápidas (RAP) e integridade da membrana plasmática (IMP). Essas análises foram realizadas com as amostras a fresco (imediatamente após a recuperação dos espermatozoides), e os resultados são mostrados na figura 1.

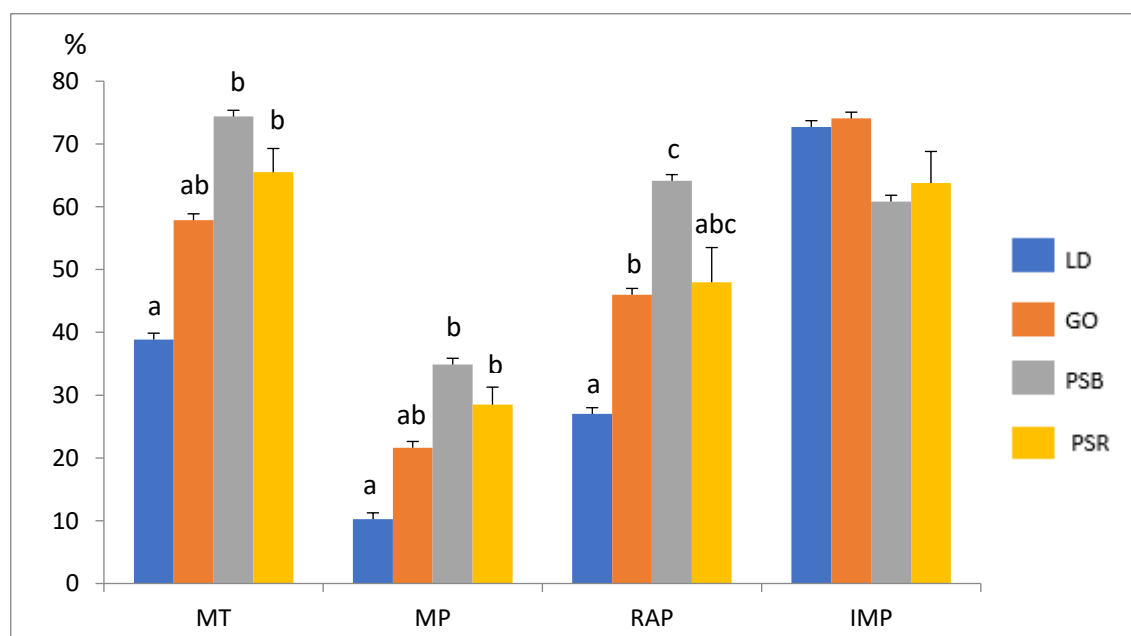
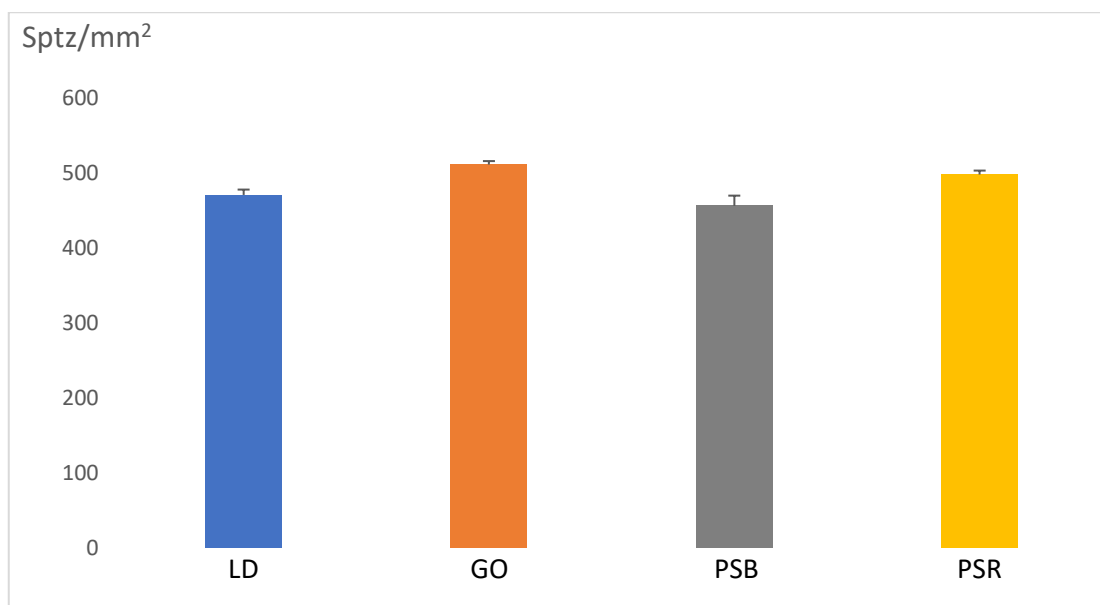


Fig. 1. Parâmetro de cinética espermática e integridade de membrana dos diferentes grupos. MT motilidade total, MP motilidade progressiva, RAP espermatozoides rápidos, IMP integridade de membrana plasmática.

Letras minúsculas diferentes para mesma variável, diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

Grupo controle foi adicionado apenas diluente a base de leite desnatado (LD), foi adicionado diluente de congelamento Botu-Crio® (GO), foi adicionado plasma seminal de garanhão com alta fertilidade (PSB), foi adicionado plasma seminal de garanhão fertilidade e capacidade de refrigeração inferior (PSR).

230 Quanto ao uso do modelo de explante bovino para realizar o teste de ligação com
231 espermatozoides equinos demonstrou-se eficiente, por apresentar espermatozoides
232 ligados com as células da tuba uterina, após a cultura. A média do número de
233 espermatozoides ligados por milímetro quadrado de explante foi de 484 entre os grupos
234 tratados. No entanto não apresentou diferença estatística entre os tratamentos.



235

236

237

238

239

Fig. 2. Número de espermatozoide por mm² de explantes.

Grupo controle foi adicionado apenas diluente a base de leite desnatado (LD), foi adicionado diluente de congelamento Botu-Crio® (GO), foi adicionado plasma seminal de garanhão com alta fertilidade (PSB), foi adicionado plasma seminal de garanhão fertilidade e capacidade de refrigeração inferior (PSR).

240

4. Discussão

241

242

243

A técnica de lavagem por fluxo retrógrado relatada por Bruemmer et al. (2002) e Monteiro et al. (2011) se mostrou eficiente e prática na recuperação de espermatozoides da cauda do epidídimo de garanhões da raça Mini-horse.

244

245

O grupo controle de Guasti et al. (2013), que foi lavado também com meio diluente a base de leite desnatado, a fresco apresentou valores de cinética espermática bastante

246 inferiores, MT $17,1 \pm 14,0$ %, MP $5,5 \pm 6,0$, RAP $9,4 \pm 8,9$, quando comparado com o
247 grupo controle GA, que apresentou MT 38,9 %, MP 10,2 e RAP 27.

248 Para Usselman e Cone (1983) e Guasti et al. (2013), não é necessário um ativador
249 externo para iniciar a motilidade, já que os espermatozoides imóveis começam a se mover
250 imediatamente após a exposição de meios que contribuem apenas com o suporte
251 osmótico. Os espermatozoides são mantidos imobilizados no epidídimo por uma
252 glicoproteína de alto peso molecular (imobilina), que inibe a motilidade por criar um
253 ambiente com alta viscoelasticidade. Os altos valores de cinética mesmo no LD, podem
254 ser explicados devido ao baixo volume do líquido epididimário do Mini-horse quando
255 comparado com garanhões de raça maior, pois houve uma alta diluição e maior oferta de
256 componentes do diluidor na lavagem por fluxo retrogrado, o qual pode ter ativado a
257 cinética espermática.

258 Os valores de cinética do LD e GO são semelhantes aos encontrados por Monteiro et
259 al. (2011), que avaliaram a motilidade logo após a lavagem da cauda do epidídimo
260 também com diluente a base de leite desnatado, posteriormente foi centrifugado e
261 ressuspendido com Botu-Crio®, sendo que no presente trabalho o GO não foi
262 centrifugado para receber o Botu-Crio®.

263 Os espermatozoides adquirem a sua capacidade de movimento a medida que
264 percorrem o epidídimo. A base bioquímica para esse evento ainda é em parte
265 desconhecida. No entanto, as principais teorias discutidas e pesquisas demonstram que
266 são vários mecanismos separados, mas que atuam de forma sinérgica para ativar a
267 cinética. Para Guasti et al. (2013) seus resultados indicam que os constituintes energéticos
268 e pH dos meios diluentes são responsáveis por ativarem a motilidade do espermatozoide,
269 nesse sentido, a diferença nos valores da cinética espermática neste trabalho nos
270 diferentes grupos é facilmente explicada.

271 O reservatório espermático regula o tempo de capacitação dos espermatozoides
272 (Fazeli et al., 1999; Tienthai et al., 2004), ajudando a mantê-los viáveis no trato reprodutor
273 feminino e sincronizando a liberação destes com a ovulação (Pollard et al., 1991). A
274 formação do reservatório depende da integridade da membrana espermática (Green et al.,
275 2001; Gwathmey et al., 2003; Foye-Jackson et al., 2011; Kadirvel et al., 2012) o que
276 poderia ser atribuída a baixa porcentagem de ligação nos grupos PSB e PSR do presente
277 experimento.

278 Os resultados obtidos pelo grupo de Carneiro et al. (2017), sugerem que o plasma
279 seminal desempenha um papel importante na ligação dos espermatozoides às células
280 epiteliais da tuba evidenciando maior ligação dos espermatozoides do ejaculado quando
281 comparado com os do epidídimo. Estes resultados discordam com os achados do presente
282 trabalho, onde não foi observada diferença nos grupos que continham adição de plasma
283 seminal, no entanto uma das possíveis discrepâncias foi que no presente estudo após
284 adição dos diferentes meios em cada grupo, não foi realizada uma centrifugação previa à
285 co-incubação dos espermatozoides com os explantes.

286 Interessantemente que neste estudo mostrou maior número de espermatozoides
287 ligados por área de explante quando comparado com outros estudos (Carneiro et al., 2017;
288 De Paw et al., 2002), sugerindo que a adição de agentes capacitantes no meio de
289 incubação dos explantes com os espermatozoides, altera a viabilidade espermática
290 limitando a ligação ao epitélio.

291 Na égua, os resíduos de galactosil, que parecem estar associados a ligação do
292 espermatozoide ao reservatório, foi encontrado em maior quantidade no istmo, e durante
293 a fase estrogênica do ciclo estral (Ball et al., 1997). O que consistente com a adesão
294 aumentada de espermatozoides aos explantes do oviduto durante o estro (Thomas et al.,

1994) justificando o maior número de espermatozoides por área ligado do nosso estudo uma vez que realizou-se a seleção de istmos para aquisição dos explantes.

A seleção das tubas de novilhas não gestantes e sem presença de corpo lúteo em ambos ovários, foi realizada visto que pesquisas com espermatozoides humanos evidenciou-se que a presença de progesterona aumenta os níveis de cálcio nos espermatozoides (Lishko et al., 2011; Strunker et al., 2011), junto com um aumento no pH, produzindo uma hiperativação espermática que impede a ligação dos espermatozoides ao epitélio da tuba uterina, ou produz um desprendimento prematuro (Bureau et al., 2002; Gonzalez et al., 2012; Aalberts et al., 2013).

5. Conclusão

Com base nos resultados obtidos é possível concluir que a adição de plasma seminal de diferentes doadores interfere de forma diferente na cinética de espermatozoides da cauda do epidídimo, aumentando a motilidade total e progressiva e a porcentagem de espermatozoides rápidos quando tiveram contato com o plasma seminal de um garanhão doador com melhor cinética espermática quando comparado a um plasma seminal de um doador com menores valores de cinética. No entanto a adição de plasma seminal não aumentou a taxa de ligação de espermatozoides colhidos da cauda do epidídimo equino por área de explante da tuba uterina bovina, acredita-se que os fatores do plasma seminal que interferem na cinética são diferentes dos responsáveis pela interação do espermatozoide com o epitélio da tuba uterina.

6. Referências

- Aalberts M, Sostaric E, Wubbolts R, Wauben MW, Nolte-'t Hoen EN, Gadella BM, Stout TA, Stoorvogel W et al. Spermatozoa recruit prostasomes in response to capacitation induction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 2013;1834(11): 2326-35.
- Bader H. An investigation of sperm migration into the oviducts of the mare. *Journal of Reproduction and Fertility* 1982;32:59-64.
- Ball BA, Dobrinski I, Fagnan MS, Thomas PG. Distribution of glycoconjugates in the uterine tube (oviduct) of horses. *American Journal of Veterinary Research* 1997;58:816-822.
- Bruemmer JE, Reger H, Zibinski G, Squires EL. Effect of storage at 5 °C on the motility and cryopreservation of stallion epididymal spermatozoa. *Theriogenology* 2002;58: 405-407.
- Bureau M, Bailey JL & Sirard MA. Binding regulation of porcine spermatozoa to oviductal vesicles in vitro. *Journal of Andrology* 2002;23:188-193.
- Caballero I, Parrilla I, Almiñana C, Del Olmo D, Roca J, Martinez EA, et al. Proteínas do plasma seminal como moduladores da função espermática e sua aplicação em biotecnologias espermáticas. *Reproduction in Domestic Animals* 2012;47(3):12-21.
- Carneiro JAM, Monteiro GA, Martin I, Maziero RRD, Sancler-Silva YFR, Freitas-Dell' Aqua CP, Guasti PN, Hartwig FP, Ignácio FS, Landim FC, Alvarenga MA, Papa FO, DELL'AQUA JAJr. Oviduct binding capacity of cryopreserved equine ejaculated and epididymal spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science* 2017;59:40-48.
- De Pauw IMC, Van Soom A, Laevens H, Verberckmoes S, De Kruif, A. Sperm binding to epithelial explants in bulls with different non-return rates investigated with a new in vitro model. *Biology of Reproduction* 2002;67:1073-1079.
- Fazeli A, Duncan AE, Watson PF, Holt WV. Sperm-oviduct interaction: Induction of capacitation and preferential binding of uncapacitated spermatozoa to oviductal epithelial cells in porcine species. *Biology of Reproduction* 1999;60:879-86.

- 349 Foye-jackson OT, Long JA, Bakst MR, Blomberg LA, Akuffo VG, Silva MVB, et al.
 350 Oviductal expression of avidin , avidin-related protein-2 , and progesterone receptor in
 351 turkey hens in relation to sperm storage : Effects of oviduct tissue type , sperm presence
 352 , and turkey line. Poultry Science 2011;9:1539-47.
- 353 Gonzalez-Fernandez L, et al. Calcium-calmodulin and pH regulate protein tyrosine
 354 phosphorylation in stallion sperm. Reproduction 2012;144(4):411-22.
- 355 GuastI PN,Monteiro GA, Maziero RR, Martin I, Avanzi BR, Dellaqua,JA, Papa FO.
 356 Effects of pentoxifylline on equine epididymal sperm. Journal of equine veterinary
 357 Science 2013;33(12):1153-56.
- 358 Gwathmey TM, Ignatz GG, Mueller JL, Manjunath P, Suarez SS. Bovine seminal plasma
 359 proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30- kDa share functional roles in storing sperm in
 360 the oviduct. Biology of Reproduction 2006;75:501-507.
- 361 Gwathmey TM, Ignatz GG, Suarez SS. PDC-109 (BSP-A1/ A2) promotes bull sperm
 362 binding to oviductal epithelium in vitro and may be involved in forming the oviductal
 363 sperm reservoir. Biology of Reproduction 2003;69:809-815.
- 364 Hartwig FP, Lisboa FP, Monteiro GA, Maziero RRD, Freitas-Dell`Aqua C P, Alvarenga
 365 MA, Papa FO, Dell`Aqua Jr JA. Use of cholesterol-loaded cyclodextrin: An alternative
 366 forbad cooler stallions. Theriogenology 2014;81:340-346.
- 367 Kadirvel G, Machado SA, Korneli C, Collins E, Miller P, Kelsey N, et al. Porcine Sperm
 368 Bind to Specific 6-Sialylated Biantennary Glycans to Form the Oviduct Reservoir Porcine
 369 Sperm Bind to Specific 6-Sialylated Biantennary Glycans to Form the Oviduct. Biology
 370 of Reproduction 2012;87:147-1.
- 371 Lishko PV, Botchkina IL & Kirichok Y. Progesterone activates the principal Ca²⁺C
 372 channel of human sperm. Nature 2011;471:387-391.
- 373 Monteiro GA, Papa FO, Zahn FS, Dellaqua JA, Melo CM, Maziero RRD, Guasti, PN.
 374 Cryopreservation and fertility of ejaculated and epididymal stallion sperm. Animal
 375 reproduction science 2011;127(3):197-201.
- 376 Pollard JW, Plante C, King WA, Hansen PJ, Betteridge KJ, Suarez SS. Fertilizing
 377 Capacity of Bovine Sperm May to Oviductal Epithelial Be Maintained by Binding.
 378 Biology of Reproduction 1991;44:102-7.

379 SAS Institute. 2011. SAS/STAT User's Guide. Version 9.3, SAS Institute Inc., Cary, NC

380 Scott MA, Liu IK, Overstreet JW. Sperm transport to the oviducts: abnormalities and their
381 clinical implications. In: Proc Annual Convention Am Association Equine Practitioners
382 1995;41:1-2.

383 Strünker T, Goodwin N, Brenker C, Kashikar ND, Weyand I, Seifert R & Kaupp UB.
384 The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca^{2+} influx in human sperm.
385 Nature 2011;471:382-386.

386 Thomas PGA, Ball BA, Brinsko SP. Interaction of equine spermatozoa with oviduct
387 epithelial cell *explants* is affected by estrous cycle and anatomic origin of explant.
388 Biology Reproduction 1994;51:222-228.

389 Tienthai P, Johannisson A, Rodriguez-martinez H. Sperm capacitation in the porcine
390 oviduct. Animal Reproduction Science 2004;80:131-46.

391 Usselman MC, Cone RA. Rat sperm are mechanically immobilized in the caudal
392 epididymis by immobilin, a high molecular weight glycoprotein. Biology of
393 Reproduction 1983;29:1241-1253.

394

395

396

397

398

399

400

401

402

403

404

405