

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**CRIOPRESERVAÇÃO E FERTILIDADE DE ESPERMATOZOIDES
DO EJACULADO E RECUPERADOS DA CAUDA DO EPIDÍDIMO
DE GARANHÕES SUBFÉRTEIS**

GABRIEL AUGUSTO MONTEIRO

BOTUCATU – SP

MAIO/2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**CRIOPRESERVAÇÃO E FERTILIDADE DE ESPERMATOZOIDES
DO EJACULADO E RECUPERADOS DA CAUDA DO EPIDÍDIMO
DE GARANHÕES SUBFÉRTEIS**

GABRIEL AUGUSTO MONTEIRO

Tese apresentada junto ao Programa
de Pós-graduação em Medicina
Veterinária para obtenção do título de
Doutor.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa

BOTUCATU - SP

MAIO/2013

Nome do Autor: Gabriel Augusto Monteiro

Título: CRIOPRESERVAÇÃO E FERTILIDADE DE ESPERMATOZOIDES DO
EJACULADO E RECUPERADOS DA CAUDA DO EPIDÍDIMO DE GARANHÕES
SUBFÉRTEIS

COMISSÃO EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Fabíola Soares Zahn
Membro
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP - Botucatu

Prof. Dr. José Antonio Dell`aqua Junior
Membro
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP - Botucatu

Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda
Membro
Departamento de Reprodução Animal
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo - USP

Prof. Dr. André Maciel Crespilho
Membro
Departamento de Reprodução Animal
UNISA

Data da Defesa: 02 de Maio de 2013

*Dedico este trabalho aos meus pais e a
minha irmã, pela educação e incentivo
que me permitiram a realização de um
sonho.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter colocado pessoas tão especiais 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 Viçosa, pela minha formação acadêmica fundamental em meus avanços profissionais.

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

Aos meus pais, Ana Rita e José Carlos, meu alicerce, pelo amor incondicional.

Ao Professor Titular Frederico Ozanam Papa, pela amizade e ensinamentos preciosos desde a residência, exemplo de dedicação e profissionalismo, por ter confiado em minha capacidade profissional e minhas ideias durante esses anos.

Aos Funcionários do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Cris, Raquel, Edilson, Zé Luiz, Edvaldo e Walter, pelos bons momentos de convívio e pela amizade.

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

Aos Professores Kleber da Cunha Peixoto, André Maciel Crespilho e José Pantoja pela realização da análise estatística.

Ao Dr. José Carlos Martin, pela amizade e ajuda fundamental na realização do projeto de pesquisa.

Ao Haras Itapuã em nome de todos os seus funcionários, pelo grande apoio e auxílio pela disponibilidade de ganhões para a prática experimental.

A minha família em Botucatu, fundamentais em todos os momentos: Ana Paula, Fernanda, Yamê, Aline, Mariana, Jair, Caco, Sabrina, Mariana, Isabelle, Bianca, Daniel, Rombudo, Felipe, Nina, Stefane, Loreta, Natalia, Helene, Heloisa, Elisa, Meia, Luana, Roberta, Zara, Livia, Natalie, Natalia, Queijo, Bruna, Mari, Tácia, Luiz, Bió, Ian,...

Aos Pós-Graduandos do Ceran: Priscilla, Aline, Mariana, André, Bió, Nina, Felipe, Fernando, Alexandre, Rombudo, Yamê, Camila Luba, Camila, Rosiára, Patrícia e Ian, pela ajuda, convivência, troca de conhecimentos, amizade que tornaram os dias tão agradáveis durante esses anos.

Aos residentes, Yamê, Caroline, Luana, Isabelle, Mariane, Meia, Luiz (Gão), Endrigo, Luiz Fernando, Sidney e Felipe pela amizade, ajuda e troca de conhecimento durante esses anos.

Aos Colegas Pós-Graduandos pelo convívio e amizade por todos esses anos.

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

LISTA DE ABREVIATURAS

μL: microlitro

μm/s: micrômetro por segundo

CASA: análise computadorizada de motilidade espermática

cm: centímetro

D: direito

DEF: defeitos morfológicos

E: esquerdo

EJ: ejaculado

EP: epidídimo

g: força de centrifugação

h: hora

HTMO: Hamilton Thorne Research

ICSI: injeção intracitoplasmática de espermatozoide

IMP: integridade de membrana plasmática

MESA: aspiração microcirúrgica de espermatozoides do epidídimo

mg: miligrama

mL: mililitro

mm³: milímetro cúbico

MP: motilidade progressiva

MT: motilidade total

°C: graus Celsius

PS: plasma seminal

RAP: espermatozoides rápidos

TA: temperatura ambiente

VCL: velocidade curvilínea

VSL: velocidade linear progressiva

SUMÁRIO**RESUMO****ABSTRACT**

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Anatomofisiologia do epidídimo.....	4
2.2. Plasma seminal.....	5
2.3. Colheita de espermatozoides da cauda do epidídimo.....	9
2.3.1. Técnicas de colheita de espermatozoides do epidídimo.....	9
2.3.1.1. Métodos utilizados em pacientes vivos.....	9
2.3.1.2. Métodos utilizados em animais mortos.....	10
<i>Método de flutuação</i>	10
<i>Método de perfuração</i>	10
<i>Fluxo retrógrado da cauda do epidídimo</i>	11
2.4. Fertilidade de espermatozoides da cauda do epidídimo	13
3. HIPÓTESES	17
4. OBJETIVO	19
5. REFERÊNCIAS	21
6. ARTIGO 1	34
7. ARTIGO 2	70
8. CONCLUSÕES	95
9. ANEXOS	97

MONTEIRO, G. A. **Criopreservação e fertilidade de espermatozoides do ejaculado e recuperados da cauda do epidídimo de garanhões subfêrteis**. Botucatu. 2013 Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Apesar dos benefícios proporcionados pelo plasma seminal durante a cobertura, quando biotecnologias são utilizadas, como a inseminação artificial, sua função é questionável, visto que trabalhos utilizando espermatozoides da cauda do epidídimo acrescido ou não do plasma seminal não apresentaram diferença nas taxas de concepção. Além disso, estudos relataram efeito deletério das secreções das glândulas anexas sobre a viabilidade espermática e taxa de concepção, principalmente em garanhões com baixa qualidade seminal. Neste sentido, o objetivo do presente estudo é: 1) comparar os parâmetros de cinética espermática, viabilidade estrutural e fertilidade dos espermatozoides recuperados do ejaculado e da cauda do epidídimo de garanhões subfêrteis; 2) avaliar diferenças na composição eletrolítica do plasma seminal de animais com alta e baixa fertilidade. 3) comparar o efeito da adição de plasma seminal de garanhões de alta e baixa fertilidade sobre a congelabilidade e viabilidade dos espermatozoides do ejaculado e da cauda do epidídimo de garanhões subfêrteis. As avaliações das amostras seminais consistiram na análise computadorizada das características da motilidade (CASA, Thorne Research - HTM IVOS) e nas análises de citometria de fluxo da integridade da membrana plasmática, da integridade acrossomal, da peroxidação das membranas espermáticas, da fragmentação do DNA, da capacitação espermática, da translocação de fosfatidilserina da membrana e da ativação de caspase. Os espermatozoides do epidídimo após descongelação apresentaram superioridade nos parâmetros de cinética e viabilidade espermática, além de melhor fertilidade, demonstrando que estes espermatozoides são mais resistentes ao processo de congelamento quando comparado aos espermatozoides do ejaculado. O plasma seminal de garanhões subfêrteis apresentou maiores concentrações de sódio no plasma seminal que garanhões férteis, sendo este achado uma possível forma de explicar o efeito deletério do plasma seminal nestes animais. Além disso, foi constatado que a adição de 20% de plasma seminal de animais férteis e subfêrteis previamente a congelamento dos espermatozoides da cauda do epidídimo não prejudicou à qualidade espermática.

Palavras-chave: criopreservação, cauda do epidídimo, plasma seminal, sódio, subfertilidade.

MONTEIRO, G. A. **Cryopreservation and fertility of ejaculated and epididymal subfertile stallion sperm.** Botucatu. 2013 Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Despite the benefits provided by seminal plasma during natural cover when biotechnology are used as artificial insemination, its function is questionable, since studies using spermatozoa from cauda epididymis with or without the addition of seminal plasma showed no difference in conception rates. Furthermore, studies have reported deleterious effects of secretions from accessory glands on sperm viability and conception rate, especially in stallions with poor semen quality. Thus the aims of this study were: 1) compare the kinetic parameters, structural viability and fertility of sperm recovered from ejaculate and cauda epididymis of subfertile stallions. 2) evaluate differences in electrolyte composition in the seminal plasma of animals with high and low fertility. 3) compare the effect of seminal plasma addition from stallions with high and low fertility on freezability and viability of sperm from the ejaculate and cauda epididymis of subfertile stallions. The assessment of each samples was determined by computer-assisted sperm analyses of motility (CASA, Thorne Research - HTM IVOS) and flow cytometry analyses of plasma membrane integrity, acrosome integrity, peroxidation of sperm membranes, DNA fragmentation index, degree of protein tyrosine phosphorylation in sperm surface and caspase activity. The epididymal sperm after thawing showed superiority in kinetic parameters and sperm viability, as well as better fertility, demonstrating that these spermatozoa are more resistant to freezing process when compared to sperm from the ejaculate. The seminal plasma of subfertile stallions has higher sodium concentrations in the seminal plasma than fertile stallions, what makes this finding a possible way to explain the deleterious effect of seminal plasma in these animals. Moreover, it was found that this deleterious effect is dose-dependent since the addition of 20% of seminal plasma from fertile and subfertile animals previously to freezing the sperm from cauda epididymis not impaired the sperm quality.

Keywords: sperm cryopreservation, cauda epididymis, seminal plasma, sodium, subfertile.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A colheita de espermatozoides da cauda do epidídimo visa à recuperação de células espermáticas de garanhões de alto valor genético com morte súbita, eutanasiados, submetidos à orquiectomia bilateral de emergência ou acometidos por processos obstrutivos nos ductos deferentes e ampola. Além disso, acredita-se que garanhões com baixa viabilidade espermática podem beneficiar-se desta técnica visto que os espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo não têm contato com as secreções das glândulas anexas, que podem causar efeito deletério (MOORE & HIBBIT, 1976; MOUSTAFA & MESZAROS, 1981).

A primeira prenhez utilizando espermatozoides congelados na espécie equina foi relatada em uma égua inseminada com espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo (BARKER & GANDIER, 1957). Apesar de comprovada a fertilidade desses espermatozoides, os estudos com sêmen equino por muitos anos limitaram-se à preservação de espermatozoides provenientes do ejaculado.

Somente nos últimos anos, alguns pesquisadores intensificaram o estudo da recuperação e preservação de espermatozoides viáveis da cauda do epidídimo (TIPLADY et al., 2002; JAMES et al., 2002; MORRIS, 2002; HERRERA et al., 2006; PAPA et al., 2008; MONTEIRO et al., 2011a; 2011b; 2012; 2013a, 2013b). Parte deste empenho foi promovido pelo crescente interesse na preservação de espécies ameaçadas de extinção e preservação de células espermáticas de animais de produção de alto valor genético.

As pesquisas concentram-se em técnicas de colheita de espermatozoides epididimários (CARY et al., 2004; BRUEMMER, 2006), comparação de meios diluentes (MELO et al., 2008; PAPA et al., 2008; GUAISTI et al., 2009), refrigeração dos espermatozoides epididimários (MONTEIRO et al, 2013b), viabilidade espermática

após adição de plasma seminal (MORRIS et al., 2002; TIPLADY et al., 2002; MOORE et al., 2005; PASQUINI, et al., 2008; HEISE et al., 2010; 2011), viabilidade espermática de garanhões subfêrteis (MONTEIRO et al., 2011a), fertilidade (MELO et al., 2008; PAPA et al., 2008; MONTEIRO, et al., 2011a; 2011b) e metodologias de inseminação (MORRIS, 2002) e injeção intracitoplasmática de espermatozoide (HERRERA et al., 2006).

Em equinos espermatozoides epididimários podem ser utilizados em inseminações artificiais com sêmen fresco (MORRIS et al., 2002) ou congelado (BARKER & GANDIER, 1957; MORRIS et al., 2002; MELO et al., 2008; PAPA et al., 2008; MONTEIRO et al., 2011b), possibilitando a obtenção de produtos de garanhões afastados da reprodução ou mesmo após sua morte.

Um estudo recente comparou a viabilidade espermática dos espermatozoides do ejaculado colhido com vagina artificial em relação aos recuperados do epidídimo de dois garanhões subfêrteis e observou que a motilidade total, motilidade progressiva, número de espermatozoides rápidos e integridade de membrana foram superiores nos espermatozoides recuperados do epidídimo quando comparado aos do ejaculado, tanto a fresco quanto após descongelação (MONTEIRO et al., 2011a).

O objetivo do presente estudo foi comparar a viabilidade entre os espermatozoides colhidos do ejaculado e recuperados da cauda do epidídimo com e sem adição de plasma seminal de garanhões subfêrteis. Para isso foi avaliado parâmetros de cinética espermática, índices de fragmentação de DNA, peroxidação lipídica, taxa de apoptose, capacitação espermática e fertilidade dos espermatozoides do ejaculado e do epidídimo. Além disso, também foram avaliadas características eletrolíticas do plasma seminal de garanhões férteis e subfêrteis.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Anatomofisiologia do Epidídimo

À medida que os espermatozoides passam pelo epidídimo os mesmos sofrem importantes alterações morfofuncionais (BARTH & OKO, 1989). O epidídimo é um órgão alongado e enovelado localizado na superfície dorsal do testículo (SULLIVAN et al., 2005), que pode ser dividido anatomicamente em três segmentos: a cabeça, onde há absorção de fluidos (MARENCO, 2008); corpo, onde os espermatozoides passam a apresentar capacidade de fecundação; e por último a cauda, cuja função básica é armazenamento e manutenção de espermatozoides maduros (SHIVAJI, 1988).

Os efeitos fisiológicos da aquisição de macromoléculas no epidídimo são requeridos para o desenvolvimento de motilidade e capacidade fecundante, mas estes mecanismos não estão completamente elucidados (JONES, 1998). A importância da aquisição de macromoléculas é sustentada por estudos que apresentaram melhores taxas de fertilização, utilizando espermatozoides colhidos da cauda do epidídimo quando comparado a amostras colhidas da cabeça e do corpo epididimário (YOUNG, 1931; ORGEBIM-CRIST, 1969; HOLTZ & SMIDT, 1976).

Após a maturação dos espermatozoides, estes são armazenados na cauda do epidídimo. O número de espermatozoides armazenados varia de acordo com o padrão reprodutivo, acasalamento e comportamento social de uma determinada espécie. Ao saírem do epidídimo os espermatozoides recebem as secreções das glândulas anexas (MAXWELL & JOHNSON, 2000).

O plasma seminal parece ser essencial na cobertura natural servindo como transportador e protetor de espermatozoides. No entanto, com a utilização de biotecnologias como a inseminação artificial sua função é questionável, visto que trabalhos utilizando espermatozoides da cauda do epidídimo crescido ou não do

plasma seminal não diferiram significativamente em relação aos parâmetros de cinética espermática (MORRIS et al., 2002; TIPLADY et al., 2002; MORRIS, 2004; MOORE et al., 2005; PASQUINI, et al., 2008; MONTEIRO, et al., 2011b).

2.2. Plasma Seminal

O plasma seminal consiste em um fluido produzido pela rede testis, epidídimo e glândulas acessórias. Este fluido é expelido em frações durante a ejaculação e sua composição apresenta diferentes aspectos bioquímicos de acordo com a fração expelida. A primeira porção ejaculada é a fração pré-espermática, aquosa, e provém das glândulas bulbouretrais e próstata e possui a função de limpeza da uretra. A segunda porção é rica em espermatozoides, leitosa, e é composta por secreções do epidídimo e da ampola do ducto deferente. A terceira porção contém poucos espermatozoides, mas grandes quantidades de ácido cítrico e gel proveniente das vesículas seminais, que arrastam os poucos espermatozoides que ainda restam na uretra (AMANN & GRAHAM, 1993).

Após o trânsito pelo epidídimo, os espermatozoides sofrem várias transformações na membrana devido ao contato com a secreção proveniente das glândulas acessórias (BOUÉ et al, 1996). O conhecimento dos fatores do plasma seminal que podem desestabilizar a membrana dos espermatozoides é de extrema importância. A composição iônica do plasma seminal varia nas diferentes espécies, sendo alguns íons associados a alterações fisiológicas (SKANDHAN et al, 1992).

Os espermatozoides sofrem influência do ambiente iônico do plasma seminal, deste modo, níveis anormais de Ca, Mg e Zn podem afetar a capacidade de fertilização dos espermatozoides (HONG et al., 1884, SKANDHAN et al., 1992).

O cálcio é um elemento regulador essencial de muitos processos fisiológicos. No espermatozoide ele está envolvido em várias etapas da maturação e motilidade

espermática (YANAGIMACHI & USUI, 1974; HONG et al, 1984) e reação acrossomal (YANAGIMACHI & USUI, 1974).

O magnésio é outro elemento determinante na fisiologia celular. Ele atua como cofator em mais de 300 reações enzimáticas envolvidas no metabolismo energético e na síntese de ácidos nucleicos (ABOU-SHAKRA et al., 1989).

O zinco possui atividade antioxidante (BARRIER-BATTUT et al, 2002) e antibacteriana (CHIA et al, 2000). Além disso, desempenha papel marcante na motilidade e estabilização da membrana dos espermatozoides (BARRIER-BATTUT et al, 2002). Altas concentrações de zinco no plasma seminal podem exercer influência no perfil lipídico da membrana, acarretando, assim, modificações no processo de capacitação e reação acrossomal (EGGERT-KRUSE et al., 2002).

O selênio é um componente crucial na atividade da enzima glutatona peroxidase (OLDEREID et al., 1998). Dessa forma, o aumento dos níveis de selênio no plasma seminal implica em maior ação antioxidante, prevenindo a peroxidação lipídica das membranas (KENDALL et al, 2000). Este efeito provavelmente acarretará em melhor fertilidade visto que evidências têm sugerido que a baixa capacidade antioxidante no sêmen pode estar relacionada à infertilidade masculina (Sikka, 2004).

O plasma seminal de garanhões é composto por altas concentrações de sódio quando comparado a outras espécies (MANN, 1981). Esta característica pode prejudicar a qualidade espermática, já que altos níveis de sódio e potássio no meio podem induzir peroxidação lipídica espontânea na membrana espermática (ALVAREZ & STOREY, 1982). Essa hipótese é ratificada por Kareskoski et al. (2005) que demonstraram que o fluido pré-espermático de garanhões possui altas concentrações de Cl^- e Na^+ , substâncias estas reportadas como nocivas à sobrevivência espermática durante a

refrigeração e armazenagem (NISHIKAWA, 1959; PADILLA & FOOTE, 1991; KARESKOSKI et al., 2006).

As técnicas de criopreservação de sêmen preconizam a retirada do plasma seminal, substituindo-o por diluentes, uma vez que estudos demonstraram que o acréscimo de plasma seminal promove um efeito deletério sobre a preservação das células espermáticas (KARESKOSKI & KATILA, 2008). Há relatos na literatura de que a adição de plasma seminal em concentração reduzida ($\leq 5\%$) mantém a qualidade do sêmen descongelado, ocorrendo o oposto quando se remove totalmente ou se adiciona altas concentrações (10-30%) de plasma seminal (ALGHAMDI et al., 2002).

O efeito da adição do plasma seminal ao sêmen é contraditório, devido à grande variabilidade na composição bioquímica deste fluido entre ganhões (AURICH et al., 1996; ZAHN et al., 2006). Estudos relataram que a adição de plasma seminal de ganhões de alta congelabilidade melhorou a qualidade do sêmen descongelado de ganhões de baixa congelabilidade, ocorrendo o oposto quando se adicionou o plasma proveniente de ganhões de baixa congelabilidade. Este mesmo trabalho demonstrou que a variabilidade individual na composição do plasma seminal é um dos fatores que determinam a congelabilidade do sêmen de ganhões (AURICH et al., 1996).

Algumas pesquisas relataram que o plasma seminal pode levar a prejuízos na fertilidade e congelabilidade do sêmen. Estes trabalhos demonstraram que proteínas presentes no plasma seminal podem levar a alterações bioquímicas, que aumentariam a permeabilidade da membrana, promovendo injúria celular (MOORE & HIBBIT, 1976; MOUSTAFA & MESZAROS, 1981).

Diversos trabalhos demonstraram que a criopreservação do sêmen aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). As ROS induzem dano ao DNA espermático e causam rápida perda do potencial de fertilização dos espermatozoides

através da peroxidação lipídica da membrana (BALL, 2008). Agentes antioxidantes enzimáticos (catalase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase) e não enzimáticos (albumina, taurina, hipotaurina, piruvato, ácido ascórbico, tocoferol e ergotionina) são encontrados no plasma seminal, a fim de proteger os espermatozoides do dano celular causado pelo estresse oxidativo (KANKOFER et al., 2005).

Kankofer et al. (2005) investigaram a atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase, assim como a lipoperoxidação em sêmen equino refrigerado. Estes autores observaram que a preservação do sêmen por 24 horas a 5°C não alterou as atividades enzimáticas, bem como não aumentou a lipoperoxidação, sugerindo que a atividade das enzimas inibe a peroxidação dos lipídios da membrana pelas ROS.

Almeida (2006) avaliou diferentes concentrações de plasma seminal (0%, 5%, 25%, 50%) na proteção contra o estresse oxidativo e danos na viabilidade de espermatozoides equinos criopreservados e concluiu que a adição de plasma seminal protege contra a peroxidação lipídica durante a criopreservação. Entretanto, quando utilizado em concentrações acima de 25%, evidencia-se uma redução na viabilidade do espermatozoide, indicando que baixas concentrações de plasma seminal são essenciais para a manutenção da qualidade espermática.

Entretanto, Love et al. (2005) constataram que a remoção prévia de plasma seminal do sêmen equino refrigerado por 24-48 horas protege a integridade do DNA espermático. Além disso, danos ao DNA aumentaram à medida que foi adicionado plasma seminal às amostras, sugerindo que substâncias que compõem o plasma seminal são prejudiciais à integridade do DNA espermático.

2.3 Colheita de espermatozoides da cauda do epidídimo

A colheita de espermatozoides viáveis do epidídimo tem sido relatada em inúmeras espécies, como bovinos (MARTINS et al., 2009), cervídeos (MARTINEZ-PASTOR et al., 2005a; MARTINEZ-PASTOR et al., 2006; FERNANDES-SANTOS et al., 2009), caprinos (MARTINEZ-PASTOR et al., 2005b), felinos (GAÑÁN et al., 2009) e equinos (PAPA et al., 2008; HEISE et al., 2010). Estudos recentes demonstraram que o número total de espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo de garanhões é superior ao encontrado em ejaculados (GRANEMANN, 2006; MURADÁS et al., 2006; MONTEIRO et al., 2011b). Além disso, estas células apresentam motilidade progressiva igual ou superior aos espermatozoides do ejaculado (TIPLADY et al., 2002; MONTEIRO et al., 2011b).

2.3.1 Técnicas de colheita de espermatozoides do epidídimo

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).

Existem cinco métodos básicos para recuperação de espermatozoides do epidídimo. Usualmente, duas técnicas são aplicadas a colheitas *in situ* em pacientes vivos e três são utilizadas para colheita em peças obtidas de animais mortos ou castrados (GUERRERO, 2006).

2.3.1.1 Métodos utilizados para colheita *in situ* em pacientes vivos

A aspiração microcirúrgica de espermatozoides do epidídimo (MESA) (TEMPLE-SMITH et al., 1985; SILBER et al., 1994) e a aspiração percutânea de espermatozoides do epidídimo (PESA) (SHRIVASTAV et al., 1994) são, normalmente, aplicadas em humanos e representam um grande avanço biotecnológico no combate à infertilidade masculina.

2.3.1.2 Métodos utilizados para colheita em peças obtidas de animais mortos ou castrados

Método de Flutuação

O método de flutuação consiste em cortar ou fatiar a cauda do epidídimo (Figura 1a e 1b). Várias incisões longitudinais são realizadas para expor os espermatozoides ao meio exterior. Logo após, a cauda do epidídimo é mantida em um meio gelatinoso, possibilitando a migração dos espermatozoides para o meio (Figura 1c) e sua posterior recuperação através de filtração (YU & LEIBO, 2002). Apesar de ser frequentemente aplicada a espécies de pequeno porte devido ao tamanho de seus epidídimos, esta técnica também pode ser utilizada na recuperação de espermatozoides do epidídimo de espécies de grande porte (HISHINUMA et al., 2003; GUERRERO, 2006).

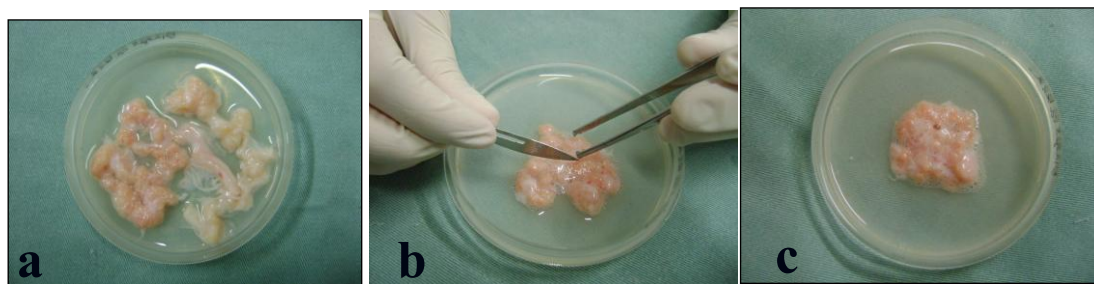


FIGURA 1 – Etapas que antecedem a recuperação de espermatozoides pela técnica de flutuação consistem: (a) separação da cauda do epidídimo e remoção do tecido conjuntivo que recobre a cauda do epidídimo; (b) incisões para proporcionar a migração dos espermatozoides do lúmen da cauda do epidídimo e (c) repouso para migração dos espermatozoides para o meio diluente (MONTEIRO et al., 2009c).

Método de Perfuração

Na técnica de perfuração, a cauda do epidídimo é colocada em uma placa de petri e o ducto epididimário é perfurado com auxílio de uma agulha (BARTELS et al., 2000) Posteriormente, as amostras são filtradas e centrifugadas para diminuir a presença de detritos celulares. Esta técnica proporciona uma elevada taxa de recuperação de espermatozoides, entretanto a viabilidade espermática pode ser afetada devido à exposição à centrifugação e componentes sanguíneos (GUERRERO, 2006).

Fluxo retrógrado da Cauda do Epidídimo

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

A técnica de fluxo retrógrado modificada, relatada por Granemann (2006), consiste na separação do complexo testículo-epidídimo (Figura 2a) seguida pela remoção dos tecidos que envolvem o epidídimo a partir da dissecação do tecido conjuntivo que recobre a cauda do epidídimo (Figura 2b). Após desfazer os contornos do ducto epididimário (Figura 2c), este deve ser seccionado em três partes para facilitar a lavagem.

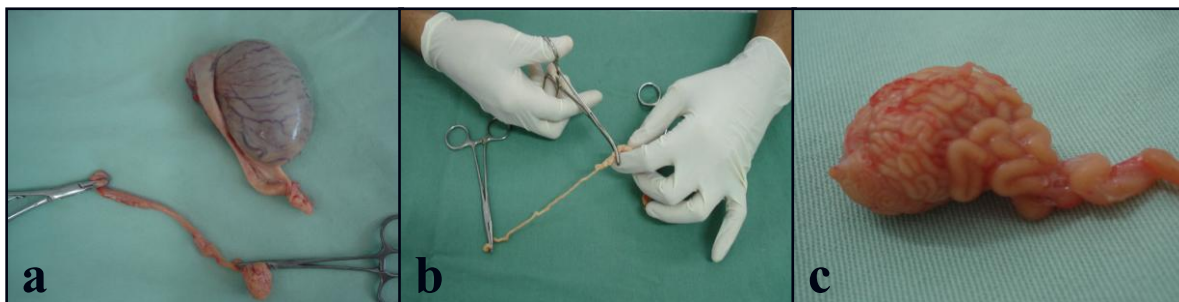


FIGURA 2 – Etapas que antecedem a recuperação de espermatozoides pela técnica de fluxo retrógrado consistem: **(a)** separar o complexo testículo-epidídimo; **(b)** remover o tecido conjuntivo que recobre a cauda do epidídimo e **(c)** desfazer os contornos da cauda do epidídimo (MONTEIRO et al., 2009c).

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

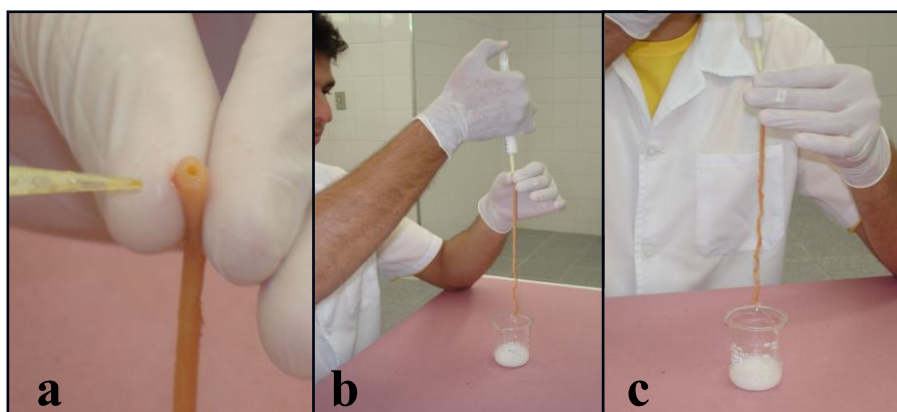


FIGURA 3 – recuperação de espermatozoides do epidídimo pela técnica de fluxo retrógrado: após a secção do ducto da cauda do epidídimo em três partes ele é estendido na posição vertical e o diluente injetado no lúmen até a outra extremidade **(a, b, c)** (MONTEIRO et al., 2009c).

Um estudo realizado com cervídeos por Martinez-Pastor et al. (2006) foram comparados os método de fluxo retrógrado com a técnica de flutuação para recuperação de espermatozoides do epidídimo. Foram observados maiores concentrações espermáticas quando utilizada a técnica de fluxo retrógrado. Além disso, estas amostras

apresentavam menor quantidade de hemácias, o que pode ser considerado outra vantagem no emprego do método de fluxo retrógrado.

A colheita de espermatozoides da cauda do epidídimo em garanhões mostrou-se eficiente em recuperar células espermáticas (TIPLADY et al., 2002; JAMES et al., 2002; BRUEMMER, 2006; MELO et al., 2008; PAPA et al., 2008). Além disso, estudos demonstraram que o número total de espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo é superior ao número de espermatozoides obtidos por vagina artificial (MURADÁS et al., 2006; MONTEIRO et al., 2011a; 2011b).

2.4. Fertilidade de espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo

Embora a primeira prenhez utilizando espermatozoides congelados na espécie equina tenha sido relatada em uma égua inseminada com espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo (BARKER & GANDIER, 1957), por muito tempo, os estudos com sêmen equino limitaram-se à preservação de sêmen do ejaculado.

Somente nos últimos anos, alguns pesquisadores intensificaram o estudo na recuperação e preservação de espermatozoides da cauda do epidídimo (HERRERA et al., 2006; MELO et al., 2008; PAPA et al., 2008; MONTEIRO et al., 2011a; 2011b).

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

Heise et al. (2010) compararam a taxa de concepção de espermatozoides recuperados da cauda epidídimo e acrescidos ou não de plasma seminal (PS). A dose

inseminante utilizada foi de 200×10^6 espermatozoides apresentando motilidade progressiva. Com isto, os pesquisadores obtiveram taxas de concepção de 55,6% com o uso de espermatozoides do ejaculado a fresco, e de 38,9% com o uso de congelados. Já com o uso de espermatozoides provenientes do epidídimo, as taxas de fertilidade obtidas na presença do plasma seminal foram de 75,0% para espermatozoides frescos e de 27,8% para espermatozoides congelados. Na ausência do plasma seminal, estes valores foram de 22,2% e 6,7% com o uso de espermatozoides a fresco e congelado, respectivamente. Este estudo demonstrou a maior capacidade fecundante dos espermatozoides obtidos do epidídimo de garanhões após adição de plasma seminal.

Morris (2002) relatou que inseminações histeroscópicas utilizando 200×10^6 espermatozoides da cauda do epidídimo resultaram em taxa de 45% de éguas gestantes quando inseminadas a fresco. Utilizando a mesma dose inseminante com espermatozoides congelados, obtiveram 18 e 8% de concepção quando as éguas foram inseminadas por histeroscopia e método convencional, respectivamente. Tais resultados comprovam ser possível a obtenção de produtos com espermatozoides do epidídimo mesmo com uma baixa dose inseminante.

Papa et al. (2008), comprovaram a fertilidade dos espermatozoides criopreservados recuperados da cauda do epidídimo sem contato com plasma seminal, obtendo taxa de concepção de 66,6% em éguas inseminadas no ápice do corno com 800×10^6 de espermatozoides moveis pré-congelação. Mesmo com a alta taxa de concepção alcançada nessa pesquisa não foi possível comparar a fertilidade dos espermatozoides da cauda do epidídimo com os do ejaculado. Nesse sentido, Monteiro et al. (2011b) compararam a fertilidade após descongelação dos espermatozoides do ejaculado (g1), recuperados do epidídimo imediatamente após orquiectomia (g2) e recuperados do epidídimo após armazenamento de 24 horas a 5°C (g3). As inseminações artificiais

foram realizadas após a ovulação utilizando 800×10^6 de espermatozoides móveis pré congelamento no ápice do corno uterino e as taxas de concepção obtidas foram, respectivamente, 61,5% (g1), 92,3% (g2) e 61,5% (g3), demonstrando que os espermatozoides do epidídimo são tão férteis quanto os do ejaculado.

Monteiro et al. (2013b) compararam a viabilidade dos espermatozoides do ejaculado e os recuperados da cauda do epidídimo após refrigeração. Os parâmetros (motilidade total, motilidade progressiva e integridade de membrana) dos espermatozoides do epidídimo tanto 24 quanto 48 horas de refrigeração a 5°C foram significativamente superiores ($p < 0,05$) aos espermatozoides colhidos com vagina artificial, demonstrando que estes espermatozoides são mais resistentes ao processo de refrigeração.

Outro estudo realizado por Monteiro et al. (2011a) demonstrou que os espermatozoides da cauda do epidídimo de garanhões com baixa qualidade seminal apresentaram resultados laboratoriais superiores aos do ejaculado ($p < 0,05$). Além disso, estes espermatozoides do epidídimo pós-congelamento apresentaram taxa de concepção de 25% em 8 éguas inseminadas pós ovulação na ponta do corno uterino utilizando dose de 400×10^6 de espermatozoides móveis. Estes estudos mostram que os espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo podem ser utilizados com êxito em biotecnologias da reprodução. Esta técnica possibilita a utilização de espermatozoides a fresco, refrigerados ou congelados.

3. HIPÓTESES

3. HIPÓTESES

Os espermatozoides do ejaculado de garanhões subfêrteis possuem queda da qualidade devido ao seu contato com secreções das glândulas anexas, levando a maior índice de alterações morfológicas, peroxidação lipídica, apoptose, fragmentação de DNA e conseqüentemente menor fertilidade quando comparado aos espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo.

Existem diferenças na composição iônica do plasma seminal de garanhões com alta e baixa fertilidade. O nível eletrolítico anormal do plasma seminal de garanhões subfêrteis pode prejudicar a viabilidade espermática e conseqüentemente a fertilidade.

A adição de plasma seminal de garanhões subfêrteis aos espermatozoides provenientes da cauda do epidídimo podem causar alterações na membrana plasmática acarretando em menor viabilidade espermática.

4. OBJETIVO

4. OBJETIVO

O presente trabalho tem por objetivo:

- 4.1 Comparar os parâmetros cinéticos e morfológicos e integridade da membrana plasmática de espermatozoides provenientes da cauda do epidídimo com os do ejaculado de garanhões subfêrteis.
- 4.2 Comparar o índice de apoptose, peroxidação lipídica e fragmentação de DNA após descongelação de espermatozoides provenientes da cauda do epidídimo com os espermatozoides do ejaculado de garanhões subfêrteis.
- 4.4 Comparar fertilidade de espermatozoides criopreservados da cauda do epidídimo de garanhões subfêrteis com os espermatozoides colhidos por vagina artificial.
- 4.5 Análises das concentrações de Cálcio, Zinco, Magnésio, Sódio, Potássio e Selênio do plasma seminal de garanhões com alta e baixa fertilidade.
- 4.6 Avaliar a viabilidade dos espermatozoides da cauda do epidídimo de garanhões subfêrteis após adição de plasma seminal de garanhões férteis e subfêrteis.

5. REFERÊNCIAS

6. REFERÊNCIAS

ABOU-SHAKRA, F.R.; WARD, N.I.; EVERARD, D.M. The role of trace elements in male infertility. *Fertility and sterility*, v.52, p.307–310, 1989.

ALMEIDA, J.L. *Efeito de diferentes concentrações de plasma seminal na criopreservação do sêmen equino*. 2006. 16p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília.

ALGHAMDI, A.S.; FOSTER, D.N.; TROEDSSON, M.H.T. Equine seminal plasma binding to polymorphonuclear neutrophils (PMN) and improves the fertility of fresh semen inseminated into inflamed uteri. *Reproduction*, v.127, p.593-600, 2004.

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

BALL, B.A. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. *Animal Reproduction Science*, v.107, p.257-267, 2008.

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.; TAINTURIER, 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.

BARTELS, P.; LUBBE, K.; KILIAN, I.; FRIEDMANN, Y.; VAN DYK, G.; MORTIMER, D. In vitro maturation and fertilization of lion (*Panthera leo*) oocytes using frozen thawed epididymal spermatozoa recovered by cauda epididymectomy of an immobilized lion. *Theriogenology*, v.53, n.1, p.325, 2000. (Abstract).

BARTH, A.D.; OKO, R.J. *Abnormal morphology of bovine spermatozoa*. Ames: Iowa State University Press, 1989. 285p.

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.

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

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

CARY, J.A.; MADILL, S.; FARNSWORTH, K.; HAYNA, J.T.; DUOOS, L.; FAHNING, M.L. A comparison of electroejaculation and epididymal sperm collection techniques in stallions. *The Canadian Veterinary Journal*, v.45, n.1, p.35-41, 2004.

EGGERT-KRUSE, W.; ZWICK, E.M.; BATSCHULAT, K.; ROHR, G.; ARMBRUSTER, F.P; PETZOLDT, D.; STROWWITZKI, T. Are zinc levels in seminal plasma associated with seminal leukocytes and other determinants of semen quality? *Fertility and Sterility*, v.77, p.260-269, 2002.

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

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, n.1, p.2003, 1994.

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.

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

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

HEISE, A.; AHN, W.K.; 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.

HEISE, A.; THOMPSON, P.N.; GERBER, D. Influence of seminal plasma on fresh and post-thaw parameters of stallion epididymal spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, v.123, p.192-201, 2011.

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.

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

HONG, C.Y.; CHIANG, B.N.; TURNER, P. Calcium ion is the key regulator of human sperm function. *Lancet*, v.2, p.1449 –1451. 1984

JAMES, A.N.; GREEN, H.; HOFFMAN, S.; LANDRY, A.M.; PACCAMONTI, D.; GODKE, R.A. Preservation of equine sperm stored in the epididymis at 4 °C for 24, 48, 72 and 96 hours. *Theriogenology*, v.58, n.2, p.401-404, 2002.

JONES, R. Plasma membrane structure and remodeling during sperm maturation in the epididymis. *Journal of Reproduction and Fertility*, 53, p.73-84, 1998.

KANKOFER, M.; KOLM, G.; AURICH, J.; AURICH, C. Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5⁰C. *Theriogenology*, v.63, p.1354-1365, 2005.

KARESKOSKI, A.M.; REILAS, T.; SANKARI, S.; ANDERSSON, M.; KATILA, T. Composition of fractionated stallion ejaculates. *Animal Reproduction Science*, v.89, p.228–230, 2005.

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, 2006.

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.

KENDALL, N.R.; McMULLEN, S.; GREEN, A.; RODWAY, R.G. The effect of a zinc, cobalt and selenium soluble glass bolus on trace element status and semen quality of ram lambs. *Animal Reproduction Science*, v.62, p.277-283, 2000.

LOVE, C.C.; BRINSKO, S.P.; RIGBY, S.L.; THOMPSON, J.A.; BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D. Relationship of seminal plasma level and extender type to sperm motility and DNA integrity. *Theriogenology*, v. 63, p.1584-1591, 2005.

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.

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, n.3, p.471-485, 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. *Animal Reproduction Science*. v.116, p.50-57, 2009.

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.

MELO, C.M.; PAPA, F.O.; FIORATTI, E.G.; VILLAVERDE, A.I.S.B.; AVANZI, B.R.; MONTEIRO, G.; DELL'AQUA JR. J.A.; PASQUINI, D.F.; ALVARENGA, M.A. Comparison of three different extenders for freezing epididymal stallion sperm. *Animal Reproduction Science*, v.107, n.3-4, p.331, 2008.

MONTEIRO, G.A.; GUAISTI, P.N.; PAPA, F.O. Colheita e preservação de células espermáticas de garanhões recuperadas da cauda do epidídimo. *Veterinária e Zootecnia*, v.16, n.3, p.448-458, 2009.

MONTEIRO, G.A.; GUAISTI, P.N.; ROCHA, A.S.; MARTIN, I.; SANCLER-SILVA, Y.F.R.; FREITAS-DELL'AQUA, C.P.; DELL'AQUA, J.A.; PAPA, F.O. Effect of storage time and temperature of equine epididymis on the viability, motion parameters, and freezability of epididymal sperm. *Journal of Equine Veterinary Science*, v.33, p. 169-173, 2012.

MONTEIRO, G.A.; FREITAS-DELL'AQUA, C.P.; GUAISTI, P.N.; DELL'AQUA, J.A.; ALVARENGA, M.A.; LANDIM, F.C.; PAPA, F.O. Comparison of Apoptotic Cells between Cryopreserved Ejaculated Sperm and Epididymal Sperm in Stallions. *Journal of Equine Veterinary Science*, 2013a (in press).

MONTEIRO, G.A.; GUAISTI, P.N.; HARTWIG, F.P.; DELL'AQUA, J.A.; ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O. Cooling of ejaculated and epididymal stallion sperm. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 2013b (in press).

MONTEIRO, G. A.; PAPA, F. O.; GUAISTI, P. N.; FREITAS, N.P.P.; MELO, C. M.; AVANZI, B.R.; VELLOSO, N. M.; DELLAQUA JUNIOR, J. A. Fertilidade de espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo de garanhões subfêrteis. *Veterinária e Zootecnia*, v.18, 255-263, 2011a.

MONTEIRO G.A.; PAPA F.O.; ZAHN F.S.; DELL'AQUA JUNIOR J.A.; MELO

C.M.; MAZIERO R.R.D.; AVANZI, B. R.; ALVARENGA, M. A.; GUASTI, P. N. Cryopreservation and fertility of ejaculated and epididymal stallion sperm. *Animal Reproduction Science*, v.127, p.197-201, 2011b.

MOORE, H.D.M.; HIBBIT, K.C.S. The binding of labeled basic proteins by boar spermatozoa. *Journal of reproduction and fertility*. Supplement, v.46, 1976.

MOORE, I.; SQUIRES, E.L.; GRAHAM, J.K. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. *Theriogenology*, v.63, n.9, p.2372-2381, 2005.

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

MORRIS, L.H.A. Low dose insemination in the mare: an update. *Animal Reproduction Science*, v.82, n.83, p.625-632, 2004.

MOUSTAFA, A.R.; MEZAROS, I. Interrelationship between the total protein content of bovine seminal plasma and behavior of spermatozoa after freezing-and-thawing, *Acta Veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae*, v.28, n.4, p.403-408, 1981.

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

NISHIKAWA, Y. *Studies on Reproduction in Horses. Singularity and Artificial Control in Reproductive Phenomena*. Japan Racing Association, Shih Tamuracho Minatoku, Japan, 1959. 340p.

ORGEBIN-CRIST, M.C. Studies on the function of the epididymis. *Biology of Reproduction*, 1, p.155–175, 1969.

PADILLA, A.W.; FOOTE, R.H.; Extender and centrifugation effects on the motility patterns of slow-cooled stallion spermatozoa. *Journal of Animal Science*. v.69, p.3308–3313, 1991.

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.

PASQUINI, D.F.; MELO, C.M.; PAPA, F.O.; FIORATTI, E.G.; LANDIM-ALVARENGA, F.C., ALVARENGA, M.A.; ZAHN, F.S.; DE VITA, B.. DELL'AQUA JR, J.A Effects of seminal plasma and sperm motility factors on viability of epididymal sperm of stallions, *Animal Reproduction Science*, v.107, n.3-4, p. 338-339, 2008.

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

SHRIVASTAV, P.; NADKARNI, P.; WENSVOORT, S. Percutaneous epididymal sperm aspiration for obstructive azoospermia. *Human Reproduction*, v.9, p.2058–2061, 1994.

SILBER, S.J.; DEVROEY, P.; VAN STEIRTEGHEM, A.C. Conventional in vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection for patients requiring microsurgical sperm aspiration. *Human Reproduction*, v.9, p.1905–1909, 1994.

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

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.

TEMPLE-SMITH, P.D.; SOUTHWICK, G.J.; YATES, C.A.; TROUNSON, A.O.; KRETZER, D.M. Human pregnancy by in vitro fertilization (IVF) using sperm aspirated from the epididymis. *Journal in Vitro Fertility Embryo Transfer*, v.2, p.119-122, 1985.

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.

YANAGIMACHI, R.; USUI, N. Calcium dependent of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa. *Experimental Cell Research*, v.89, p.161.174, 1974.

YOUNG, W.C. A study of the function of the epididymis. III Functional changes undergone by spermatozoa during their passage through the epididymis and vas deferens of the guinea pig. *The Journal of Experimental Biology*, v.8, p.151–164, 1931.

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

ZAHN, F.S.; PAPA, F.O.; MELO, C.M. Blood serum, seminal plasma and sperm membrane protein profiles in stallions: Are they correlated to semen freezability? *Animal Reproduction Science*, v.64, p.64-66, 2006.

6. ARTIGO 1

Trabalho a ser enviado para a revista **Animal Reproduction Science** (normas de publicação especificadas no Anexo III).

Criopreservação e fertilidade de espermatozoides provenientes do ejaculado e da cauda do epidídimo de garanhões subférteis

Monteiro, G. A.¹, Ramires-Neto, C., Sancelir-Silva, Y. F. R., Hartwig, F. P., Crespilho, A. M.², Martin, I., Freitas-Dell'Aqua, C. P.¹, Papa, F. O.¹.

¹*Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu, SP 18610-970, Brazil*

²*Departamento de Reprodução Animal, Universidade de Santo Amaro, UNISA, São Paulo, Brazil*

Resumo

Apesar dos benefícios proporcionados pelo plasma seminal durante a cobertura, quando biotecnologias são utilizadas, como a inseminação artificial, sua função é questionável, visto que trabalhos utilizando espermatozoides da cauda do epidídimo acrescido ou não do plasma seminal não apresentaram diferença nas taxas de concepção. Além disso, estudos relataram efeito deletério das secreções das glândulas anexas sobre a viabilidade espermática e taxa de concepção, principalmente em garanhões com baixa qualidade seminal. Neste sentido, o objetivo do presente estudo foi comparar os parâmetros de cinética espermática, viabilidade estrutural e fertilidade dos espermatozoides recuperados do ejaculado e da cauda do epidídimo de garanhões subférteis, além de avaliar diferenças na composição eletrolítica do plasma seminal de animais com alta e baixa fertilidade. As avaliações das amostras seminais consistiram na análise computadorizada das características da motilidade (CASA, Thorne Research

- HTM IVOS) e nas análises de citometria de fluxo da integridade da membrana plasmática, da integridade acrossomal, da peroxidação das membranas espermáticas, da fragmentação do DNA, da capacitação espermática, da translocação de fosfatidilserina da membrana e da ativação de caspase. Os resultados deste estudo demonstram que o contato com as secreções provenientes das glândulas anexas no momento da ejaculação é deletério, uma vez que após descongelação os espermatozoides do epidídimo apresentaram superioridade nos parâmetros de cinética espermática, viabilidade estrutural espermática e fertilidade quando comparados aos espermatozoides do ejaculado. O fato dos espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo não entrarem em contato com o plasma seminal pode ser uma possível causa da melhor viabilidade encontrada nesse estudo, visto que o plasma seminal de garanhões subfêrteis possui altas concentrações de sódio, sendo este achado uma possível causa do efeito deletério.

Palavras-chave: criopreservação, cauda do epidídimo, plasma seminal, sódio, subfertilidade, equino.

1) Introdução

O epidídimo é um órgão alongado enovelado localizado na superfície do testículo (Sullivan et al., 2005). Pode ser dividido anatomicamente em três segmentos: a cabeça, onde ocorre absorção de fluidos (Marengo, 2008) e aquisição de motilidade progressiva pelos espermatozoides (Shivaji, 1988); o corpo, onde os espermatozoides passam a apresentar capacidade fecundante; e por último a cauda, cuja função básica é armazenamento e manutenção das células espermáticas maduras (Shivaji, 1988).

À medida que os espermatozoides passam pelo epidídimo eles sofrem importantes alterações morfofuncionais (Barth and Oko, 1989). O efeito fisiológico da aquisição de macromoléculas neste trajeto não é completamente elucidado, mas é

indispensável à obtenção da capacidade de fecundação. Para estarem aptos a fecundar, é necessário que os espermatozoides apresentem características morfofuncionais normais, características estas adquiridas em sua formação nos túbulos seminíferos e completadas na passagem pelo epidídimo e contato com secreções das glândulas anexas (Nishimune and Okabe, 1993).

O plasma seminal consiste em um fluido produzido pela rede testis, epidídimo e glândulas acessórias. Este fluido é expelido em frações durante a ejaculação e tem a função de transportar e fornecer substratos metabólicos para os espermatozoides, além de participar do processo de maturação (Troedsson et al., 2005) e capacitação espermática (Mari et al., 2011). Contudo o efeito da adição do plasma seminal ao sêmen é contraditório, devido à grande variabilidade de sua composição bioquímica apresentada no plasma seminal dos diferentes ganhos (Aurich et al., 1996; Zahn et al., 2006).

O conhecimento dos fatores do plasma seminal que podem desestabilizar a membrana dos espermatozoides é de extrema importância. Estudos relataram que alguns íons, como o cálcio, magnésio, zinco (Barrier-Battut et al., 2002), sódio (Wite, 1988; James et al., 1979) e selênio (Kendall et al., 2000), podem estar associados a alterações da função espermática. A célula espermática sofre influência do ambiente iônico do plasma seminal. Deste modo, níveis anormais de cálcio, magnésio, zinco (Hong et al., 1984, Skandhan et al., 1992), potássio e sódio (Alvarez and Storey., 1982) podem afetar a capacidade de fecundação dos espermatozoides.

O plasma seminal parece ser essencial na cobertura natural servindo como carreador e protetor de espermatozoides. No entanto, quando biotecnologias como a inseminação artificial são utilizadas, sua função é questionável visto que em trabalhos anteriores utilizando espermatozoides da cauda do epidídimo acrescido ou não do

plasma seminal não apresentaram diferenças nas taxas de concepção (Morris et al., 2002; Tiplady et al., 2002; Morris, 2004; Moore et al., 2005; Pasquini, et al., 2008).

O efeito da adição do plasma seminal ao sêmen é contraditório, devido à grande variabilidade na composição bioquímica deste fluido entre ganhões (Aurich et al., 1996; Zahn et al., 2006; Love et al., 2010). Estudos anteriores relataram que a adição de plasma seminal obtidos de ganhões de alta congelabilidade melhorou a qualidade do sêmen descongelado de ganhões de baixa congelabilidade, ocorrendo o oposto quando se adiciona o plasma proveniente de ganhões de baixa congelabilidade (Aurich et al., 1996). Adicionalmente, algumas pesquisas relataram que o plasma seminal pode levar a prejuízos à fertilidade e congelabilidade espermática (Aurich et al., 1996; Moore and Hibbit, 1976). Este efeito deletério do plasma seminal pode ocorrer devido à presença de proteínas que causam alterações bioquímicas que aumentam a permeabilidade da membrana, promovendo injúria celular (Moore and Hibbit, 1976; Moustafa and Mezanos, 1981). Este efeito não está completamente elucidado, no entanto estudo recente realizado por Monteiro et al. (2011a) demonstrou que os espermatozoides da cauda do epidídimo apresentaram parâmetros cinéticos e morfológicos superiores aos espermatozoides do ejaculado em ganhões subfêrteis.

Como o conhecimento disponível sobre o efeito da composição do plasma seminal nos espermatozoides parece estar disperso e às vezes conflitante, representando uma forte motivação para investigações nesta área (Kareskoski and Katila, 2008). O objetivo do presente estudo foi 1) comparar os parâmetros de cinética espermática, viabilidade estrutural e fertilidade dos espermatozoides criopreservados recuperados do ejaculado com os obtidos da cauda do epidídimo de ganhões subfêrteis e 2) comparar a composição bioquímica de plasmas seminais de ganhões férteis e subfêrteis.

2. Material e métodos

2.1 Experimento I

2.1.1 Colheita e processamento espermático

Foram utilizados oito garanhões de diferentes raças (três Mangalargas Paulista, quatro Mangalargas Machador e um Lusitano) com idade entre 5 a 10 anos de idade, histórico de subfertilidade e apresentando parâmetros de motilidade total e progressiva menor que 50% e 25%, respectivamente.

Inicialmente, foram coletadas três ejaculados de cada garanhão com um intervalo de 2 dias para eliminar possíveis células degeneradas da cauda do epidídimo e assim estabilizar os parâmetros espermáticos. Os oito animais foram utilizados nos grupos 1 e 2, sendo assim seus próprios controles.

No Grupo 1 (EJ) foram colhidos, com intervalo de 1 semana, dois ejaculados de cada garanhão com vagina artificial modelo Botupharma - Botucatu¹. Após a retirada da fração gel a amostra seminal foi diluída na proporção 1:1 (v/v) com o diluente Botu-Sêmen^{®2}. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 600xg por 10 minutos, o sobrenadante foi desprezado e o “pellet” ressuspendido com o diluente Botu-Crio^{®3} na concentração de 200 milhões de espermatozoides totais por mL.

Após o envase em palhetas de 0,5 mL, as amostras foram transferidas em geladeira Minitub^{®4} e permaneceram a temperatura constante de 5°C por 20 minutos. Após a refrigeração, as palhetas foram acondicionadas em caixa isotérmica de polietilenocom capacidade de 45 litros, preenchida com nitrogênio líquido N₂ até a marca de 3,5 cm de altura. As palhetas ficaram dispostas horizontalmente a 6,0 cm do nível do nitrogênio líquido por 20 minutos, e após este período, foram imersas

¹ Botupharma Ltda, Botucatu, Brasil.

² Botupharma Ltda, Botucatu, Brasil.

³ Botupharma Ltda, Botucatu, Brasil.

⁴ Minitub do Brasil Ltda, Porto Alegre, Brasil.

diretamente no N_2 e armazenadas em botijões criobiológicos previamente às avaliações seminais no mesmo, como demonstrado na figura 1.

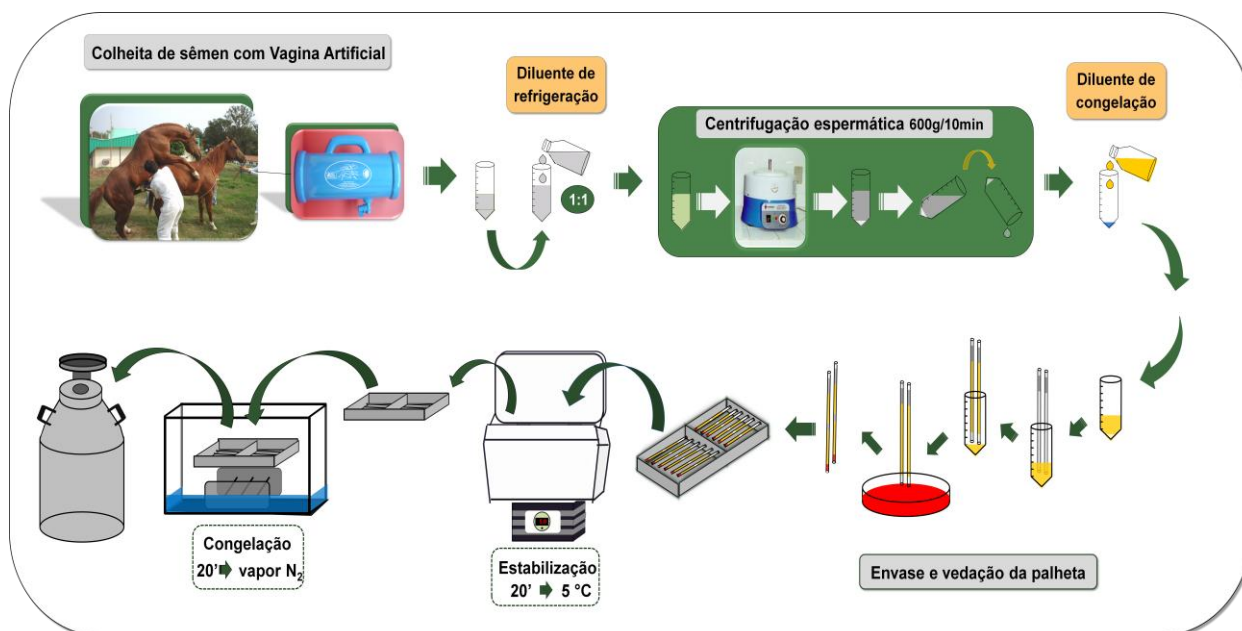


FIGURA 1: Esquema do processamento dos espermatozoides do ejaculado.

Uma semana após a última colheita de sêmen com vagina artificial, os garanhões foram submetidos à orquiectomia bilateral. Imediatamente após o procedimento realizou-se a colheita dos espermatozoides da cauda do epidídimo (Grupo 2, EP) pela técnica de fluxo retrógrado descrita por Garde et al. (1994). Baseado nesta técnica o tecido conjuntivo que recobre o epidídimo foi removido e os contornos do ducto epididimário da cauda do epidídimo foram desfeitos (Figura 2). Em seguida, o ducto epididimário foi lavado sobre pressão injetando o diluente a base de leite desnatado (Botu-sêmen[®]) no lúmen do mesmo, fazendo com que os espermatozoides fossem carreados pelo diluente (Figura 3). A congelamento dos espermatozoides do epidídimo após a colheita seguiu o mesmo protocolo descrito para a congelamento do sêmen do ejaculado (Grupo 1), como demonstrado na figura 4.

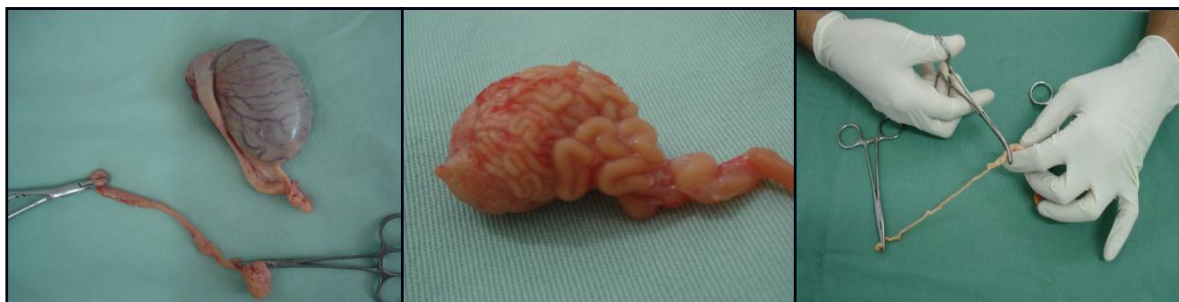


FIGURA 2 – Etapas que antecedem a recuperação de espermatozoides pela técnica de fluxo retrógrado consistem: separação do complexo testículo-epidídimo; remoção do tecido conjuntivo que recobre a cauda do epidídimo; dissecação do tecido conjuntivo entre o ducto epididimário diminuindo os contornos da cauda do epidídimo.

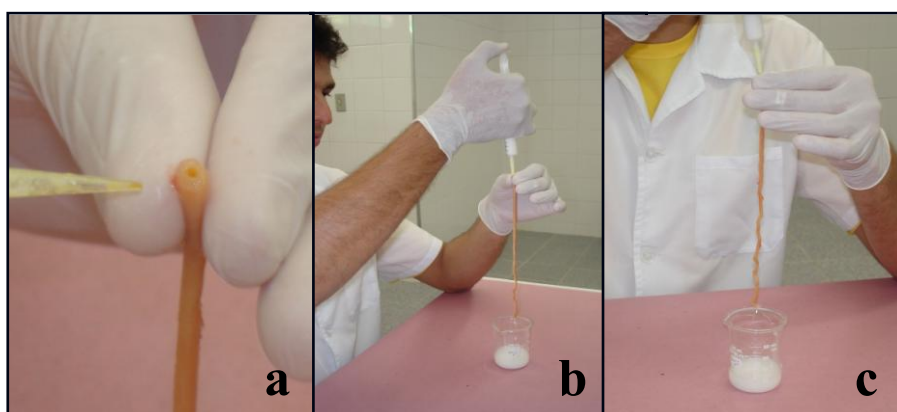


FIGURA 3 – recuperação de espermatozoides do epidídimo pela técnica de fluxo retrógrado: após a secção do ducto da cauda do epidídimo o mesmo foi estendido na posição vertical e o diluente foi injetado no lúmen até a outra extremidade (a,b,c).

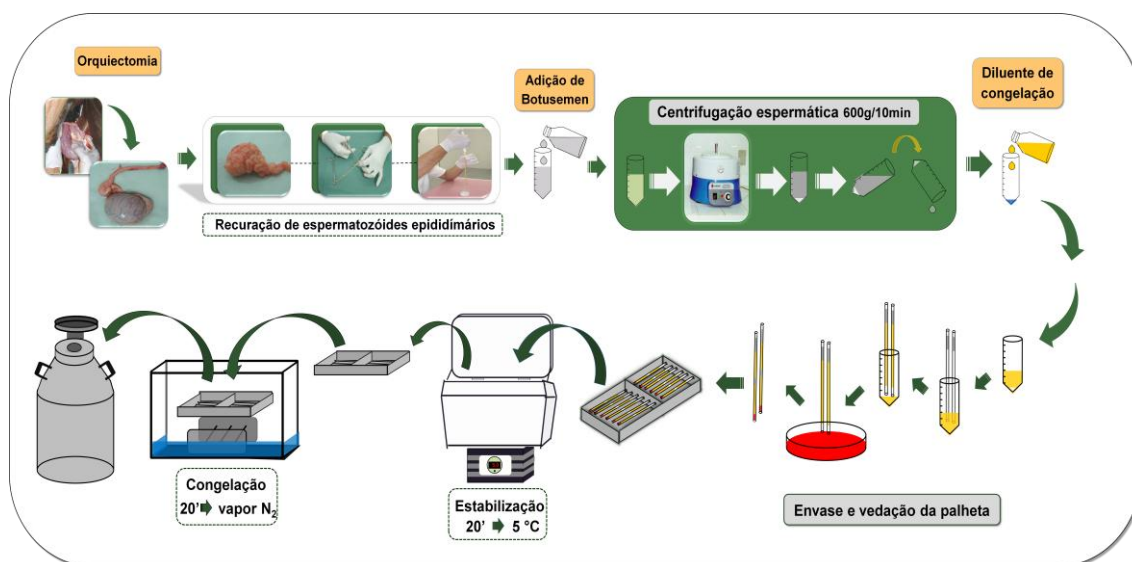


FIGURA 4: Esquema do processamento dos espermatozoides do epidídimo.

2.1.2 Análise das amostras

2.1.2.1 Análise computadorizada do movimento espermático (CASA) e integridade de membrana plasmática por microscopia de epi-fluorescência

Os espermatozoides coletados com vagina artificial e da cauda do epidídimo foram avaliados pelo método computadorizado – CASA imediatamente após a recuperação com diluente a base de leite Botu-sêmen[®] (M0), após centrifugação e ressuspensão com o diluente de congelamento (M1), imediatamente após a descongelamento (M2) e após manutenção das amostras descongeladas à 20°C por 4 horas (M3) e 8 horas (M4). Para isso as palhetas foram descongeladas a 46°C por 20 segundos (Dell'Aqua Jr. et al., 2001) e mantidas até 8 horas a 20°C.

A cinética espermática foi avaliada através do sistema Hamilton Thorne Research - HTM IVOS (Beverly, MA, USA) considerando os seguintes parâmetros: porcentagens de espermatozoides com motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP) e de espermatozoides rápidos (RAP), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$) e velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$). Uma alíquota foi destinada à análise de integridade de membrana plasmática (IMP) por microscopia de epi-fluorescência (Leica Microsystem – DMLB, Ernst-Leitz-Strabe, Wezlar Germany) usando 20 μL de 6-Diacetato de carboxifluoresceína (concentração, 0.46 mg/mL) e 10 μL de iodeto de propídio (0.5 mg/mL) (Harrison and Vickers, 1990). Além disso, a morfologia espermática foi avaliada por meio de esfregaços corados pelo método de Karras modificado por Papa et al. (1988).

2.1.2.2 Análises por citometria de fluxo

As análises de citometria de fluxo foram realizadas no sêmen após a descongelamento das palhetas à 46°C por 20 segundos (Dell'Aqua Jr., 2001). Para estas

análises foi utilizado o equipamento BD LSR Fortessa (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) equipado com lasers: azul 488-nm, 100 mW, vermelho 640-nm, 40 mW e violeta 405-nm, 100 mW. Após a análise, os dados foram arquivados para posterior avaliação através do software FACSDiva[™] software V6,2.

- Avaliação da integridade da membrana plasmática e acrossomal

Para a avaliação de integridade das membranas plasmática e acrossomal foram utilizadas as sondas iodeto de propídio (IP; P4170, Sigma) e FITC-PSA (L-0770, Sigma) de acordo com protocolo desenvolvido por Arruda et al. (2003), acrescido da adição de Hoechst 33345 (14533, Sigma) de acordo com Freitas-Dell'Aqua (2011). Assim, em uma amostra de 100 μL de sêmen diluído em TALP na concentração de 10×10^6 espermatozoides/mL foram adicionados 5 μL de IP (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e 0,5 μL de FITC-PSA (1 mg/mL) e 5 μL de Hoechst (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), e então homogeneizados e incubados por 10 minutos a 37°C por 10 minutos, após a incubação foi acrescido 400 μL de TALP para um leitura de 500 a 600 eventos por segundo.

- Avaliação da peroxidação das membranas espermáticas

Este ensaio foi realizado utilizando a probe C11-BODYPY (D-3861; Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, EUA). Assim, em uma aliquota de 100 μL do sêmen diluído em TALP a uma concentração de 10×10^6 espermatozoides/mL foi acrescido mais 399,5 μL de TALP, para uma concentração de 1×10^6 espermatozoides e 0,5 μL da sonda C11BODIPY581/591 (1mg/mL - Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, EUA) por 20 minutos à 37°C. Após o período de incubação a amostra foi centrifugada a 300g por 5 min e ressuspendida para 500 μL , e então, foi adicionados 5 μL de IP (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e 5 μL de Hoechst (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Freitas-Dell'Aqua, 2011). A amostra foi novamente

incubada por 10 minutos a 37°C. Para a avaliação da peroxidação das membranas espermáticas foram consideradas apenas as células com a membrana plasmática íntegra (IP-) e marcadas para peroxidação das membranas plasmáticas.

- Avaliação do índice da fragmentação do DNA

Esta análise foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Evenson (1986). Assim, em uma amostra de 100 µL de sêmen diluído, em solução tampão (0,186g de EDTA dissódico, 0,790g de Tris-HCl, 4,380g NaCl em 500 mL água deionizada, pH 7.4) na concentração de 1×10^6 espermatozoides/mL foram adicionados 400 µL de solução detergente ácida (2,19 g NaCl, HCl 1,0 mL de 2N solução, 0,25 mL Triton-X, em qsp. 250 ml de água deionizada, pH 1,8). A mesma foi incubada por 30 segundos e então foi acrescido 1mL de solução corante de laranja de acridina (AO; 3,8869 g de ácido cítrico mono-hidratado, 8,9429 g Na₂HPO₄, 4,3850g NaCl, 0,1700g de EDTA dissódico, 4 µg/ml de solução laranja de acridina – 1 mg/mL, em qsp. 500 ml de água, pH 6.0), a qual foi incubada por mais 30 segundo ao abrigo da luz. O índice de fragmentação de DNA (IFDNA) foi gerado a partir da análise de 10.000 células marcadas com laranja de acridina. Os dados gerados foram analisados pelo software WinList 6.0 (Verify software house). O IFDNA é a proporção, expressa em porcentagem do DNA do espermatozoide, do DNA fragmentado (fluorescência vermelha) dividida pela fluorescência total, ou seja, a soma do DNA fragmentado (fluorescência vermelha) com o DNA não fragmentado (fluorescência verde).

- Avaliação da capacitação espermática

Para esta análise em 100 µL de sêmen, previamente diluído em TALP na concentração de 10×10^6 espermatozoides por mL, foram acrescidos 900 µL de TALP

para uma concentração de 1×10^6 espermatozoides, desta nova concentração 150 μL foram colocados em um tubo de 5mL, e então, foi adicionados 5 μL de IP (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e 5 μL de Hoechst (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Freitas-Dell'Aqua, 2011) e incubados por 10 minutos à 37°C. Após a incubação foi adicionado 5 μL do anticorpo antifosfotirosina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ -CLONE PY-20, F0426 – Sigma), previamente diluído em uma solução super saturada de O-Phospho-L-tyrosine (P9405, Sigma) de modo que a concentração final do anticorpo fosse 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, foi então acrescida a solução e incubada por mais 5 minutos nas mesmas condições. Para a avaliação da capacitação espermática foram consideradas apenas as células com a membrana plasmática íntegras (IP-) e marcadas com o anticorpo.

- Avaliação da translocação de fosfatidilserina da membrana

Para esta avaliação, foram utilizadas as sondas anexina V-APC (550475; Pharmingen) de acordo com as recomendações do laboratório, acrescido de Hoechst 33345 (14533, Sigma) de acordo com Freitas-Dell'Aqua (2011). Assim, 100 μL de sêmen diluído em TALP na concentração de 10×10^6 espermatozoides/mL foram adicionados em um tubo de cultura de 5 mL e, então, acrescido de 5 μL de anexina V-FITC e adicionados 5 μL de IP (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e 5 μL de Hoechst (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e 400 μL de solução tampão de anexina V (10 mM Hepes/NaOH – pH 7,4 – 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl_2). As amostras foram homogeneizadas e incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente. As células observadas durante a análise foram classificadas como células viáveis (An-/PI-), células viáveis com translocação fosfatidilserina (An+/PI-), células lesadas com fosfatidilserina translocação (An+/PI+), ou células mortas (An+/PI). O índice de translocação de fosfatidilserina foi calculado com base na relação entre o número de An+/PI-, e o número total de An-/PI- (Ricci et al., 2002).

- Avaliação da ativação de caspase

A associação de FITC-VAD-FMK (G7462, Promega, Madison WI, EUA) foi utilizada como marcadora *in situ* de caspase ativada e IP de acordo com as recomendações do laboratório também acrescido de Hoechst 33345 (14533, Sigma) de acordo com Freitas-Dell'Aqua (2011). Assim, em 100 μL de sêmen diluído em TALP na concentração de 10×10^6 espermatozoides por mL, foram acrescidos 900 μL de TALP para uma concentração de 1×10^6 espermatozoides, nesta solução foi 1 μL de FITC-VAD-FMK a 5mM, e então homogeneizada e incubada a temperatura ambiente ao abrigo da luz por 20 minutos. Após a incubação esta solução foi lavada 2 vezes (300g/5min) e ressuspensa em TALP na concentração inicial, e então, foi adicionado 5 μL de IP (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e 5 μL de H33342 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e incubados por 15min ao abrigo da luz. As células observadas durante a análise foram classificadas como células viáveis (Caspase-/PI-), células viáveis com caspase ativada (Caspase+/PI-), células lesadas com caspase ativada (Caspase+/PI+), ou células mortas (Caspase+/PI-). O índice de translocação de fosfatidilserina foi calculado com base na relação entre o número de Caspase+/PI-, e o número total de Caspase-/PI- (Ricci et al., 2002).

2.1.3 Teste de fertilidade

Para o teste de fertilidade, foram utilizados 62 ciclos de 31 éguas, sendo que cada uma delas foi inseminada duas vezes com espermatozoides pós-descongelamento, provenientes do ejaculado e do epidídimo, de maneira randomizada. Quando constatado folículo com 35 mm foi administrado 2 mg de GnRH (deslorelina), a partir deste instante as éguas foram acompanhadas de 6 em 6 horas até a detecção da ovulação e neste momento realizou-se a inseminação com pool de 800×10^6 de espermatozoides totais, sendo uma palheta de cada garanhão (n=8). Para isso, o sêmen

foi descongelado a 46°C por 20 segundos e depositado na extremidade do corno uterino através do desvio por manipulação retal da pipeta flexível⁵. O diagnóstico de gestação foi realizado por exame ultrassonográfico transretal entre 14 e 15 dias após a ovulação.

2.1.4 Análise Estatística

Para a análise estatística foi realizada ANOVA utilizando o software Proc GLM 9.2 (SAS Institute, Cary, NC, USA). Para o modelo estatístico foram considerados os efeitos isolados do momento de avaliação espermática (momento 0 a 4), dos reprodutores (n=8 garanhões) e do tratamento (espermatozoides do ejaculado e do epidídimo), bem como suas interações, sobre os parâmetros de movimento avaliados através de CASA e sobre a viabilidade espermática avaliada em citometria de fluxo.

A análise do modelo linear geral de variância foi aplicada para identificar diferenças nos índices de fertilidade de acordo com o tratamento e foram separados usando Studente-Newmane-Kuels.

O nível de significância estatística foi definido como $p < 0,05$.

2.2 Experimento II

2.2.1 Coleta de sêmen

Para a avaliação da composição bioquímica do plasma seminal foram utilizados 18 animais férteis e com alta qualidade espermática cujos parâmetros de motilidade total e progressiva eram $\geq 80\%$ e 40% , respectivamente. Além disso, foram utilizados 12 garanhões com histórico de subfertilidade apresentando parâmetro de motilidade total e motilidade progressiva menor que 50% e 25% , respectivamente.

⁵ Minitub do Brasil Ltda, Porto Alegre-RS, Brasil

Inicialmente, três ejaculados de cada garanhão foram coletados com intervalo de dois dias com objetivo de eliminar possíveis células degeneradas da cauda do epidídimo com a finalidade de estabilizar os parâmetros espermáticos. Posteriormente todos animais foram submetidos a duas colheitas de sêmen com vagina artificial modelo Botupharma - Botucatu⁶ com intervalo de uma semana.

2.2.2 Preparação das amostras de plasma seminal

Após a colheita o sêmen foi centrifugado em tubos plásticos de 15mL a 1000xg por 15 minutos, repetindo o procedimento por 3 vezes, trocando-se o frasco sem ressuspensão do pellet. O sobrenadante final foi envasado em criotubos, imediatamente congelado em freezer a -20°C e posteriormente transferidos para freezer a -80°C, onde foram mantidos até o processamento.

2.2.3 Análise seminal

Os espermatozoides colhidos com vagina artificial foram avaliados imediatamente após a colheita pelo método computadorizado – CASA perante aos seguintes parâmetros: percentagens de espermatozoides com motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP) e de espermatozoides rápidos (RAP), velocidade linear progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$) e velocidade angular progressiva (VAP, $\mu\text{m/s}$). Uma alíquota de cada grupo foi destinada à análise de integridade de membrana plasmática (IMP) por microscopia de epi-fluorescência (Leica Microsystem – DMLB, Ernst-Leitz-Strabe, Wezlar Germany) usando 20 μL de 6-Diacetato de carboxifluoresceína (concentração, 0.46 mg/mL) e 10 μL de iodeto de propídio (0.5 mg/mL) segundo Harrison and Vickers. (1990).

⁶ Botupharma Ltda, Botucatu, Brasil.

2.2.4 Análise de plasma seminal

As dosagens de sódio e potássio foram analisadas através de espectrometria de emissão atômica (Saleh et al., 2013). As dosagens de cálcio, zinco e magnésio foram realizadas por espectrometria de absorção atômica por chama (Espectrofotômetro Shimadzu AA 6800; Silva et al., 2011). O selênio, foi dosado utilizando espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (Varian AA-800; Saleh et al., 2013).

2.2.5 Análise Estatística

Para a análise estatística foi realizada ANOVA utilizando o software Proc GLM 9.2 (SAS Institute, Cary, NC, USA). Para o modelo estatístico foram considerados os efeitos isolados do tratamento (garanhões férteis e subférteis), bem como suas interações, sobre os parâmetros de movimento avaliados através de CASA.

Para análise das variáveis: cálcio, zinco, magnésio, potássio, sódio e selênio. Fizemos uma análise de variância (ANOVA) dos dados usando o modelo linear geral (GLM) no pacote sistema de análise estatística (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA).

O nível de significância em todas as análises foi considerado significativo quando $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1. Experimento I

Tabela 1 - Valores médios e desvio padrão de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade angular progressiva (VAP), velocidade linear progressiva (VSL), espermatozoides rápidos (RAP) e integridade de membrana plasmática (IMP) dos espermatozoides do ejaculado (EJ) e dos espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo (EP) de garanhões subfêrteis imediatamente após a recuperação (M0).

Grupos	MT (%)	MP (%)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	RAP (%)	IMP (%)
EJ	27,1 \pm 16,2	8,6 \pm 7,6	96,1 \pm 91,0 ^a	71,2 \pm 14,1	29,1 \pm 17,2	38,3 \pm 14,6 ^a
EP	26,9 \pm 16,6	9,1 \pm 6,6	91,0 \pm 12,1 ^b	73,8 \pm 10,2	17,9 \pm 14,2	77,1 \pm 8,4 ^b
P	0,9575	0,8251	0,0154	0,6139	0,202	<0,0001

Os valores com letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($p < 0,05$).

Tabela 2 - Valores médios e desvio padrão de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade angular progressiva (VAP), velocidade linear progressiva (VSL), espermatozoides rápidos (RAP) e integridade de membrana plasmática (IMP) dos espermatozoides do ejaculado (EJ) e dos espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo (EP) de garanhões subfêrteis após centrifugação e ressuspensão com diluente de congelamento (M1).

Grupos	MT (%)	MP (%)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	RAP (%)	IMP (%)
EJ	34,9 \pm 14,6 ^a	10,7 \pm 5,8 ^a	87,1 \pm 14,4	64,7 \pm 9,4	26,4 \pm 12,4 ^a	33,5 \pm 13,1 ^a
EP	73,0 \pm 9,8 ^b	27,1 \pm 9,1 ^b	96,0 \pm 14,9	72,4 \pm 8,9	54,3 \pm 16,0 ^b	71,0 \pm 8,5 ^b
P	<0,0001	<0,0001	0,2168	0,1416	0,0001	<0,0001

Os valores com letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($p < 0,05$).

Tabela 3 - Valores médios e desvio padrão de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade angular progressiva (VAP), velocidade linear progressiva (VSL), espermatozoides rápidos (RAP) e integridade de membrana plasmática (IMP) dos espermatozoides do ejaculado (EJ) e dos espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo (EP) de garanhões subfêrteis após descongelamento (M2).

Grupos	MT (%)	MP (%)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	RAP (%)	IMP (%)
EJ	13,1 \pm 10,2 ^a	4,4 \pm 3,6 ^a	76,2 \pm 11,3	65,9 \pm 8,1	7,2 \pm 5,6 ^a	18,5 \pm 7,6 ^a
EP	32,5 \pm 13,0 ^b	12,2 \pm 8,9 ^b	82,1 \pm 10,1	65,5 \pm 7,7	19,4 \pm 11,6 ^b	38,9 \pm 9,6 ^b
P	<0,0001	0,0008	0,4075	0,9329	0,0045	<0,0001

Os valores com letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($p < 0,05$).

Tabela 4 - Valores médios e desvio padrão de integridade de acrossomo (IAC), integridade de membrana plasmática e acrossomo íntegros (PMAI), índice de fragmentação de DNA (IFDNA), índice de translocação de fosfatidilserina na membrana (ANEX), índice de ativação de caspase (CASP), índice de capacitação (CAP) e índice de peroxidação das membranas espermáticas (PER) dos espermatozoides do ejaculado (EJ) e dos espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo (EP) de garanhões subfêrteis após descongelamento (M2).

Grupos	IAC (%)	PMAI (%)	IFDNA (%)	ANEX (%)	CASP (%)	CAP (%)	PER (%)
EJ	52,4 \pm 11,2 ^a	18,0 \pm 7,4 ^a	2,2 \pm 1,0 ^a	2,5 \pm 2,6 ^b	6,0 \pm 4,2	1,0 \pm 0,5	4,4 \pm 2,0
EP	73,4 \pm 7,6 ^b	38,2 \pm 9,5 ^b	1,1 \pm 0,3 ^b	1,9 \pm 2,1 ^a	3,3 \pm 3,5	0,5 \pm 0,4	5,3 \pm 4,1
P	<0,0001	<0,0001	0,0004	0,0069	0,05	0,0841	0,57

Os valores com letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($p < 0,05$).

Tabela 5 - Valores médios e desvio padrão de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade angular progressiva (VAP), velocidade linear progressiva (VSL) e espermatozoides rápidos (RAP) dos espermatozoides do ejaculado (EJ) e dos espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo (EP) de ganhões subférteis mantidos quatro horas a 20°C após descongelção (M3).

Grupos	MT (%)	MP (%)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	RAP (%)
EJ	15,7 \pm 11,4 ^a	4,4 \pm 4,0 ^a	79,8 \pm 9,0	64,0 \pm 7,2	7,8 \pm 6,2 ^a
EP	35,5 \pm 14,9 ^b	11,2 \pm 6,7 ^b	83,8 \pm 11,4	65,3 \pm 6,6	22,2 \pm 13,2 ^b
P	0,0004	0,0112	0,6285	0,8243	0,0038

Os valores com letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($p < 0,05$).

Tabela 6 - Valores médios e desvio padrão de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade angular progressiva (VAP), velocidade linear progressiva (VSL) e espermatozoides rápidos (RAP) dos espermatozoides do ejaculado (EJ) e dos espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo (EP) de ganhões subférteis mantidos oito horas a 20 °C após descongelção (M4).

Grupos	MT (%)	MP (%)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	RAP (%)
EJ	5,6 \pm 5,4 ^a	1,1 \pm 1,3 ^a	64,4 \pm 32,6 ^a	54,8 \pm 26,9	2,7 \pm 3,1 ^a
EP	27,3 \pm 17,3 ^b	7,7 \pm 5,5 ^b	86,0 \pm 13,9 ^b	66,0 \pm 7,4	16,3 \pm 14,9 ^b
P	0,0001	0,0132	0,0103	0,0654	0,0057

Os valores com letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($p < 0,05$).

Tabela 7 - Valores médios e desvio padrão de defeitos morfológicos dos espermatozoides do ejaculado (G1) e da cauda do epidídimo (G2) de ganhões subférteis realizados por meio de esfregaços corados pelo método de Karras modificado.

Grupos	Cabeça*	Peça intermediária**	Cauda***	Total
EJ	6,8 \pm 4,9	4,4 \pm 4,1	41,6 \pm 23,4 ^b	52,8 \pm 21,53 ^b
EP	3,8 \pm 2,5	2,8 \pm 2,5	18,7 \pm 17,4 ^a	24,9 \pm 18,8 ^a

* Cabeça estreita na base, cabeça subdesenvolvida, cabeça isolada patológica; ** Pseudogota, edema e fratura de peça intermediária;

*** Cauda dobrada, cauda fortemente dobrada e cauda enrolada. Os valores com letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($p < 0,05$).

Tabela 8 – Taxa de prenhes de éguas inseminadas com espermatozoides provenientes do ejaculado (G1) e da cauda do epidídimo (G2) de garanhões subfêrteis.

Grupos	Éguas Vazias	Éguas Prenhes	Taxa de concepção
EJ	24	7	22,6% ^a
EP	16	15	48,4% ^b

. Os valores com letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($p < 0,05$).

3.2. Experimento II

Tabela 9 - Valores médios e desvio padrão de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade angular progressiva (VAP), velocidade linear progressiva (VSL), espermatozoides rápidos (RAP) e integridade de membrana plasmática (IMP) dos espermatozoides de garanhões férteis (FERT) e subfêrteis (SUBFERT) imediatamente após a colheita de sêmen.

Grupos	MT (%)	MP (%)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	RAP (%)	IMP (%)
FERT	87,3 \pm 4,6 ^a	49,2 \pm 7,2 ^a	127,0 \pm 13,0 ^a	100,3 \pm 9,0 ^a	81,4 \pm 6,5 ^a	77,3 \pm 8,1 ^a
SUBFERT	33,1 \pm 17,3 ^b	12,0 \pm 9,54 ^b	97,2 \pm 20,1 ^b	72,5 \pm 13,9 ^b	26,7 \pm 15,4 ^b	41,8 \pm 13,3 ^b
P	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Os valores com letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($p < 0,05$),

Tabela 10 - Valores médios e desvio padrão das concentrações de Cálcio (Ca), Zinco (Zn), Magnésio (Mg), Sódio (Na), Potássio (K) e Selênio (Se) do plasma seminal de garanhões férteis (FERT) e subfêrteis (SUBFERT).

Grupos	Ca(mg/dL)	Zn (mg/dL)	Mg (mg/dL)	Na (mg/dL)	K (mg/dL)	Se ($\mu\text{g/L}$)
FERT	16,0 \pm 10,4	0,09 \pm 0,04	8,1 \pm 8,6	0,7 \pm 0,2 ^a	9,3 \pm 4,2	8,3 \pm 4,9
SUBFERT	12,3 \pm 5,2	0,08 \pm 0,03	6,0 \pm 8,2	0,9 \pm 0,5 ^b	7,8 \pm 3,6	8,4 \pm 4,6
P	0,1103	0,1635	0,3528	0,023	0,1509	0,7116

Os valores com letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($p < 0,05$).

4. Discussão

Antigamente acreditava-se que a presença do plasma seminal fosse essencial no processo de fecundação. Contudo, pesquisas demonstraram que espermatozoides provenientes da cauda do epidídimo, sem qualquer contato com plasma seminal, têm qualidade espermática e fertilidade similar ou superior ao de espermatozoides do ejaculado (Tiplady et al., 2002; Monteiro et al., 2011b). Além disso, substâncias presentes no plasma seminal de garanhões podem apresentar efeito deletério sobre a viabilidade espermática (Brinsko et al., 2000; Andrade, 2009; Monteiro et al., 2011a, Ramires-Neto et al., 2013, Monteiro et al., 2013a).

No presente estudo não foi observada diferença nos parâmetros de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade linear progressiva (VSL) e espermatozoides rápidos (RAP) entre os grupos G1 (EJ) e G2 (EP) de garanhões subfêrteis imediatamente após a recuperação dos espermatozoides (M0; tabela 1). Esses resultados corroboram com os reportados por Monteiro et al. (2011b) os quais demonstraram similaridade nos parâmetros de cinética espermática nos espermatozoides recuperados do epidídimo quando comparados aos espermatozoides do ejaculado.

No entanto, a partir da ressuspensão dos espermatozoides com o diluente de congelação (M1; Tabela 2) e após a descongelação (M2, tabela 3; M3, tabela 5 e M4, tabela 6), os espermatozoides oriundos do epidídimo apresentaram melhor preservação para os parâmetros MT, MP e RAP em relação aos espermatozoides do ejaculado. Os resultados obtidos nos momentos M1 e M2 divergem dos observados por Monteiro et al. (2011b) que não constataram diferenças nos parâmetros de cinética espermática entre espermatozoides do ejaculado de garanhões com alta qualidade espermática. Contudo, no experimento realizado por Monteiro et al. (2011a) em garanhões com baixa qualidade seminal os resultados foram semelhantes ao presente estudo. Nos momentos

M3 e M4 a superioridade dos resultados parâmetros de cinética e viabilidade espermática corroboram com resultados anteriormente citados por Monteiro et al. (2013b).

Na análise realizada por citometria de fluxo após a descongelamento espermática, foi constatada superioridade na integridade da membrana plasmática e acrossomo no grupo EP em relação ao grupo EJ (tabela 4). Esse achado pode resultar em melhores índices fertilidade dos espermatozoides do epidídimo, pois para que ocorra o metabolismo normal do espermatozoide, capacitação e reação acrossômica é essencial que a membrana plasmática (Januskauskas et al., 2000) e acrossomo estejam íntegros (Silva and Gabella, 2006).

Na avaliação do índice de fragmentação de DNA (IFDNA) após a descongelamento (M2) pode-se constatar maior susceptibilidade do DNA à desnaturação dos espermatozoides do grupo EJ em relação ao EP. Resultado semelhante foi relatado por Love et al. (2005), que demonstraram haver aumento da fragmentação do DNA espermático na presença do plasma seminal e este fato pode levar a redução da fertilidade da amostra seminal.

No presente estudo foi constatado maior índice de translocação de fosfolipídios de membrana (ANEX) nas células provenientes do grupo EJ quando comparadas ao grupo EP, o que pode estar relacionado aos maiores índices apoptóticos ou maior fragilidade da membrana plasmática dos espermatozoides do ejaculado. Esta hipótese é ratificada por Martin et al. (1995) que relataram que durante a apoptose há exposição da fosfatidilserina que normalmente está no interior da membrana. Esta translocação da fosfatidilserina progride para uma lesão na membrana, sendo esta utilizada como marcador precoce da deterioração da membrana plasmática (Anzar et al., 2002). Além disso, outra forma de avaliar apoptose celular é a avaliação da ativação da caspase.

No presente estudo a porcentagem de células com ativação de caspase foi superior no grupo EJ. Esta observação sugere novamente uma diminuição da viabilidade dos espermatozoides do ejaculado, fato que também pode estar correlacionado com menores índices de fertilidade neste grupo. Esta teoria é suportada por estudos que demonstraram que a maior incidência de apoptose pode ser um marcador de diagnóstico da qualidade do espermatozoide (Ortega and Ferrugosa, 2008), como se mostra pelo aumento de coloração de caspase-3 em homens inférteis (Wang et al, 2000).

Em relação à análise de capacitação espermática (tabela 4), não foi constatada diferença entre espermatozoides do ejaculado e epidídimo ($0,05 < p < 0,1$). Estes achados contrastam com resultados relatados por Sostaric et al. (2010) que mostraram valores mais elevados nos espermatozoides do ejaculado quando comparados aos recuperados do epidídimo.

A melhor viabilidade espermática encontrada nos espermatozoides do epidídimo demonstrada neste estudo é particularmente importante em equinos, visto que as éguas possuem fisiologicamente longos períodos de estro e, portanto, requerem uma maior atenção para inseminá-las o mais próximo do momento da ovulação. Este fato torna-se ainda mais relevante com a utilização de espermatozoides criopreservados, pois estes possuem menor viabilidade e longevidade em comparação aos espermatozoides frescos (Watson, 2000, Andrade, 2009).

Uma vez que a principal diferença entre os espermatozoides da cauda do epidídimo e do ejaculado é a exposição temporária ao plasma seminal (Sostaric et al., 2010), pode-se sugerir que a maior viabilidade espermática dos espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo encontrada no presente estudo pode ser explicada pela ausência de contato destas células com o plasma seminal. Esta hipótese é

sustentada por estudos que demonstraram efeito deletério da presença de mais de 20% de plasma seminal provenientes de garanhões de baixa congelabilidade sobre a viabilidade espermática (Aurich et al., 1996) e refrigeração seminal (Brinsko et al., 2000; Monteiro et al., 2013a; Ramires- Neto et al., 2013). Além disso, estudos relataram que proteínas contidas no plasma seminal podem promover alterações bioquímicas, levando a danos na membrana plasmática que podem acarretar em prejuízos na fertilidade e congelabilidade espermática (Moore et al., 1976; Moustafa and Mezaros, 1981).

Na Tabela 7 pode-se observar maior porcentagem de defeitos morfológicos de cauda e totais nos espermatozoides do ejaculado quando comparados com espermatozoides da cauda do epidídimo, indicando que há uma interação deletéria entre o plasma seminal e os espermatozoides, no momento da ejaculação, levando à queda de viabilidade estrutural celular e aumento da porcentagem de defeitos de cauda, o que consequentemente acarreta em queda da motilidade nos espermatozoides do ejaculado. Estes achados corroboram com resultados obtidos por Monteiro et al. (2011a) em garanhões com baixa qualidade seminal e diferem de resultados de Monteiro et al. (2011b) em garanhões de alta qualidade seminal. Além disso, estudos realizados em bovinos por Silva et al. (2003) e Martins et al. (2007) detectaram maior frequência de defeitos morfológicos em amostras do epidídimo quando confrontadas ao sêmen do ejaculado.

Os resultados de fertilidade encontrados neste estudo demonstraram que os espermatozoides recuperados do epidídimo de garanhões subfêrteis apresentaram maior capacidade fecundante em relação aos do ejaculado ($p < 0,05$) (tabela 8). Estes resultados contrastam com os obtidos por Monteiro et al. (2011b) que obtiveram taxa de concepção similar entre os dois grupos e também diferem de Heise et al. (2010), os

quais obtiveram menor taxa de concepção com o uso dos espermatozoides recuperados do epidídimo, sem exposição ao plasma seminal, quando comparados com espermatozoides do ejaculado. As diferenças entre os estudos em relação as características seminais dos ganhões, metodologia de processamento dos epidídimos, diluente de congelação e o protocolo de inseminação artificial podem ter contribuído para obtenção de resultados contraditórios.

As taxas de concepção dos espermatozoides do epidídimo obtidos no presente estudo foram superiores às obtidas por estudos anteriores com espermatozoides a fresco (Morris et al., 2002; Heise et al., 2010) ou congelado (Barker e Gandier, 1957; Morris et al., 2002; Heise et al., 2010), semelhantes às observadas por Papa et al. (2008) e inferiores as observados por Monteiro et al. (2011b) com espermatozoides criopreservados. Entretanto, diferentemente dos estudos anteriores, a taxa de concepção dos espermatozoides do epidídimo foram superiores aos do ejaculado, demonstrando que os espermatozoides do epidídimo de ganhões subfêrteis apresentaram melhor viabilidade espermática tanto pré quanto pós congelação. Estes resultados suportam a hipótese de que os espermatozoides epididimáticos é menos sensível ao choque a frio e, por conseguinte mais resistente à congelação (Johnson et al., 1980, Monteiro et al., 2013b).

No experimento 2, houve expressiva diferença entre os valores de cinética espermática (MT, MP, VAP e VSL) e integridade de membrana plasmática entre os espermatozoides de animais com alta e baixa fertilidade (tabela 9). No entanto, não foi constatado diferença na concentração da maioria dos eletrólitos analisados no plasma seminal (Ca, Zn, Mg, K e Se), com exceção do sódio que apresentou concentração mais elevada em ganhões subfêrteis (tabela 10). O plasma seminal de ganhões é composto por altas concentrações de sódio quando comparado a outras espécies (Mann,

1981). Esta característica pode prejudicar a qualidade espermática, visto que altos níveis de sódio e potássio no meio podem induzir peroxidação lipídica espontânea na membrana espermática (Alvarez and Storey, 1982). Portanto, é possível que as altas concentrações de sódio presentes no plasma seminal dos garanhões com baixa fertilidade tenham contribuído para a diminuição dos parâmetros de motilidade e integridade de membrana dos espermatozoides do ejaculado no presente estudo. Essa hipótese é ratificada por Kareskoski et al. (2005) que demonstraram que o fluido pré-espermático de garanhões possui altas concentrações de Cl^- e Na^+ , substâncias estas reportadas como nocivas à sobrevivência espermática durante a refrigeração e armazenagem (Nishikawa, 1959; Padilla AND Foote, 1991; Kareskoski et al., 2006).

As altas concentrações de sódio encontrada no presente estudo em animais subférteis sugere que a avaliação diagnóstica de plasma seminal deve ser considerada quando suspeita-se de subfertilidade. Além disso, este achado pode explicar a ação deletéria do plasma seminal na refrigeração (Ramires-Neto et al., 2013) e na congelação espermática (Aurich et al., 1996; Monteiro et al., 2011a).

5. Conclusão

Com base nos resultados do presente estudo pode-se concluir que os espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo de garanhões subférteis possui melhor viabilidade quando comparado aos espermatozoides do ejaculado.

Após a descongelção os espermatozoides do epidídimo apresentaram também superioridade nos parâmetros de cinética espermática (MT, MP, RAP), viabilidade estrutural espermática (IMP, IAC, PMAI, IFDNA, ANEX e CASP) e fertilidade quando comparado aos espermatozoides do ejaculado.

O plasma seminal de garanhões subférteis apresenta maiores concentrações de sódio no plasma seminal quando comparado aos garanhões férteis, sendo este achado uma possível causa do efeito deletério do plasma seminal nestes animais e que pode representar um possível marcador de fertilidade.

6. Referências

Andrade, A.F.C., 2009. Efeito da adição do plasma seminal nas mudanças semelhantes à capacitação (criocapacitação) em espermatozoides criopreservados de equinos. 132p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Anzar, M., He, L., Buhr, M.M., Kroetsch, T.K., Pauls, K.P., 2002. Sperm Apoptosis in Fresh and Cryopreserved Bull Semen Detected by Flow Cytometry and Its Relationship with Fertility. *Biol. Reprod.* 66, 354–360.

Alvarez, J.G., Storey, B.T., 1982. Spontaneous lipid peroxidation in rabbit epididymal spermatozoa: its effect on sperm motility. *Biol. Reprod.* 27, 1102–1108.

Arruda, R.P., Ball, B.A., Gravance, C.G., Liu, I.K.M., 2003 Determinação da integridade da membrana plasmática e acrossomal de espermatozoides de garanhões pela técnica de citometria de fluxo. *A. Sci. Vet.* 31, 226-227.

Aurich, J.E., Kühne, A., Hoppe, H., Aurich, C., 1996. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. *Theriogenology* 46, 791-797.

Barker, C.A., Gandier, S.C.C., 1957. Pregnancy in a mare resulting from frozen epididymal spermatozoa. *Can. J. Comp. Med.* 21, 47-51.

Barrier-Battut, I., Delajarraud, H., Legrand, E., Bruyas, J.F., Tainturier, D., Thorin, C., Pouliquen, H., 2002. Calcium, magnesium, copper and zinc in seminal plasma of fertile stallions, and their relationship with semen freezability. *Theriogenology* 58, 229-232.

Barth, A.D., Oko, R.J., 1989. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Ames: Iowa State University Press 285p.

Brinsko, S.P., Crockett, E.C., Squires, E.L., 2000. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. *Theriongenology* 54, 129-136.

Dell'aqua, J.A., Papa, F.O., Alvarenga, M.A., Zahn, F.S., 2001. Effects of warming rate on sperm parameters and of insemination site and dose on the fertility of equine frozen semen. *Anim. Reprod. Sci.* 68, 344–346.

Flaherty, C.O., Vaisheva, F., Hales, B.F., Chan, P., Robaire, B., 2008. Characterization of sperm chromatin quality in testicular cancer and Hodgkin's lymphoma patients prior to chemotherapy. *Hum. Reprod.* 1-9.

Garde, J., Aguado, M., Perez, S., Garrido, D., Perez-Guzman, M., Montoro, V., 1994. Physiological characteristics of epididymal spermatozoa from postmortem rams. *Theriogenology* 41, 2003.

- Harrison, R.A.P., Vickers, S.E., 1990. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 88, 343-352.
- Heise, A., Ahn, W.K., 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.
- Hong, C.Y., Chiang, B.N., Turner, P., 1984. Calcium ion is the key regulator of human sperm function. *Lancet* 2, 1449 –1451.
- James, R.W., Heywood, R., Street, A.E., 1979. Biochemical observations on beagle dog semen. *Vet. Rec.* 104, 480-482.
- Januskauskas, A., Johannisson, A., Soderquist, L., Rodriguez-Martinez, H., 2000. Assessment of sperm characteristics post-thaw and response to calcium ionophore in relation to the fertility of Swedish dairy AI bulls. *Theriogenology* 53, 859–75.
- Johnson, L., Amann, R.P., Picckett, B.W., 1980. Maturation of equine epididymal spermatozoa. *Am. J. Vet. Res.* 41, 1190-1196.
- Kareskoski, A.M., Reilas, T., Sankari, S., Andersson, M., Katila, T., 2005. Composition of fractionated stallion ejaculates. *Ani. Reprod. Sci.* 89, 228–230.
- Kareskoski, M., Katila, T., 2008. Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. *Ani. Reprod. Sci.* 107, 249–256.

Kendall, N.R., McMullen, S., Green, A., Rodway, R.G., 2000. The effect of a zinc, cobalt and selenium soluble glass bolus on trace element status and semen quality of ram lambs. *Ani. Reprod. Sci.* 62, 277-283.

Love, C.C., Brinsko, S.P., Rigby, S.L., Thompson, J.A., Blanchard, T.L., Varner, D.D., 2005. Relationship of seminal plasma level and extender type to sperm motility and DNA integrity. *Theriogenology* 63, 1584-1591.

Love, C.C., Thompson, J.A., Brinsko, S.P., Blanchard, T.L., Varner D.D. 2010. Effect of inter-stallion seminal plasma variability on motility, viability, and DNA integrity of cauda epididymal sperm. *Anim. Reprod. Sci.* 121, 191.

Mann, T., 1981 *Male Reproductive Function and Semen*. Berlin: Springer-Verlag.

Marengo, S.R., 2008. Maturing the sperm: Unique mechanisms for modifying integral proteins in the sperm plasma membrane. *Ani. Reprod. Sci.* 105, 52-63.

Mari, G., Castagnetti, C., Rizzato, G., Mislei, B., Iacono, E., Merlo, B. 2011. Density gradient centrifugation of sperm from a subfertile stallion and effect of seminal plasma addition on fertility. *Anim. Reprod. Sci.* 126, 96-100,

Martin, S.J., Reutelingsperger, C.P., McGahon, A.J., Rader, J.A., Van Schie, R.C., LaFace, D.M., Green, D.R., 1995. Early redistribution of plasma membrane

phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J. Experim. Med.* 182, 1545–1556.

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. *Ani. Reprod. Sci.* 101, 326–331.

Monteiro, G.A., Papa, F.O., Guasti, P.N., Freitas, N.P.P., Melo, C.M., Avanzi, B.R., et al., 2011a. Fertility of epididymal cauda sperm from subfertile stallions. *Vet. Zootec.* 18, 255-63.

Monteiro, G.A., Papa, F.O., Zahn, F.S., Dell'aqua Jr, J.A., Melo, C.M., Maziero, R.R.D., et al., 2011b. Cryopreservation and fertility of ejaculated and epididymal stallion sperm. *Anim. Reprod. Sci.* 127, 197-201.

Monteiro, G.A., Guasti, P.N., Hartwig, F.P., Dell'aqua, J.A., Alvarenga, M.A., Papa, F.O., 2013a. Cooling of ejaculated and epididymal stallion sperm. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* (in press).

Monteiro, G.A., Freitas-Dell'aqua, C.P., Guasti, P.N., Dell'aqua, J.A., Alvarenga, M.A., Landim, F.C., Papa, F.O., 2013b. Comparison of apoptotic cells between cryopreserved ejaculated sperm and epididymal sperm in stallions. *J. Equine Vet. Sci.* (in press).

Moore, H.D.M., Hibbit, K.C.S., 1976 The binding of labeled basic proteins by boar spermatozoa. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 46.

Moore, I., Squires, E.L., Graham, J.K., 2005. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. **Theriogenology** 63, 2372-2381.

Morris, L., Tiplady, C., Allen, W.R., 2002. The in vivo fertility of cauda epididymal spermatozoa in the horse. *Theriogenology* 58, 643-646.

Morris, L.H.A., 2004. Low dose insemination in the mare: an update. *Anim. Reprod. Sci.* 82, 625-632.

Moustafa, A.R., Mezaros, I., 1981. Interrelationship between the total protein content of bovine seminal plasma and behavior of spermatozoa after freezing-and-thawing. *Acta. Vet. Acad. Scient. Hung.* 4, 403-408.

Nishikawa, Y., 1959. Studies on reproduction in horses. singularity and artificial control in reproductive phenomena. Japan Racing Association, Shih Tamuracho Minatoku, Japan, 340p.

Nishimune, Y., Okabe, M., 1993. Mammalian male gametogenesis, growth, differentiation and maturation of germ cells. *Dev. Growth Differ.* 34, 479-486.

Ortega-Ferrusola, C., Sotillio-Galan, Y., Varela-Fernandez, E., Gallardo- Bolanos, J.M., Muriel, A., Gonzalez-Fernandez, L., et al., 2008. Detection of “Apoptosis-Like” changes during cryopreservation process in equine sperm. *J. Androl.* 29, 213-221.

Padilla, A.W., Foote, R.H., 1991. Extender and centrifugation effects on the motility patterns of slow-cooled stallion spermatozoa. *J. Ani. Sci.* 69, 3308–3313.

Papa, F.O., Alvarenga, M.A., Carvalho, I.M., Bicudo, S.D., Ramires, P.R.N., Lopes, M.D., 1988. Coloração espermática segundo karras modificado pelo emprego do barbatimão (*Stryphnodendrum barbatiman*). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 40, 115-23.

Papa, F.O., Melo, C.M., Fioratti, E.G., Dell'aqua, J.A., Zahn, F.S., Alvarenga, M.A., 2008. Freezing of stallion epididymal sperm. *Anim. Reprod. Sci.* 107, 293-301.

Pasquini, D.F., Melo, C.M., Papa, F.O., Fioratti, E.G., Landim-Alvarenga, F.C., Alvarenga, M.A., Zahn, F.S., De Vita, B., Dell'aqua Jr, J.A, 2008. Effects of seminal plasma and sperm motility factors on viability of epididymal sperm of stallions, *Anim. Reprod. Sci.* 107, 338-339.

Ramires Neto, C, Monteiro, G.A., Soares. R.F., Pedrazzi, C., Dell'aqua, J.A., Papa, F.O., Alvarenga, M.A., 2013. Effect of removing seminal plasma using a sperm filter on the viability of refrigerated stallion semen. *J. Equine Vet. Sci.* 33, 40-43.

Ricci, G., Perticarari, S., Fragonas, E., Giolo, E., Canova, S., Pozzobon C., 2002. Apoptosis in human sperm: its correlation with semen quality and the presence of leukocytes. *Hum, Reprod.* 17 , 2665–2672.

Saleh, M.A.D., Neves, R.C.F., Silva, F.A., Moraes, P.M. Loureiro, V.R., Roldan, P.S. Padilha, P.M. 2009. GFAAS determination of zinc in fish feed and feces using slurry sampling. *Food Anal Method*, 2, 162-168.

Saleh, M.A.D., Berto, D.A., Padilha, P.M. 2013. Ultrasound-assisted extraction of Na and K from swine feed and its application in a digestibility assay: a green analytical procedure. *Ultrason Sonochem.* 20, 1-8.

Silva, F.A., Padilha, C.C.F., Castro, G.R., Roldan, P.S., Nogueira, A.R.A., Moraes, P.M., Padilha, P.M. 2011. Selenium determination in tissue samples of Nile tilapia using ultrasound-assisted extraction. *Cent Eur J Chem.* 9,119-125.

Silva, P.F.N., Gadella, B.M., 2006. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology* 65, 958-78.

Silva, A.E.D.F., Dias, A.L., Unanian, M.M., Freitas, A.R., Blach, C.J., 2003. Conteúdo de peptídeos e avaliação morfofisiológica dos espermatozoides do epidídimo e ejaculado de bovinos. *Rev. Bras. Zootec.* 32, 1890-1900.

Skandhan, K.P., 1992. Review on copper in male reproduction and contraception. *Rev.Fran. de Gyn cet D'obst.* 87, 594–598.

Sostaric, E., Kraan, H., Stout, T.A.E. 2010. Role of seminal plasma in the attainment of fertilizing capacity by stallion epididymal sperm. *Anim. Reprod. Sci*, 121, 194-185.

Sullivan, R., Saez, F., Girouard, J., Frenette, G., 2005. Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. *Blood Cells Mol. Dis.*, 35, 1-10.

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.

Troedsson, M.H.T., Desvougues, A.S., Alghamdi, A.S., Dahms, B., Dow, C.A., Hayna, J., Valesco, R., Collahan, P.T., Macpherson, M.L., Pozor, M., Buhi, W.C., 2005. Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. *Ani. Reprod. Sci.* 89, 171-186.

Wang, G.R., Zhou, Z.D., Ge, Z.M., Zhao, M.J., 2000. Preliminary investigation of relationship between sperm apoptosis and male infertility. *Zhonghua Nan Ke Xue.* 8, 25-27.

Wite, I.G., 1988. Secreções do trato reprodutivo masculino e plasma seminal. In: HAFEZ, E.S.E. *Reprodução Animal*, 4 ed. São Paulo: Manole, 212-228.

Zahn, F.S., Papa, F.O., Melo, C.M., 2006. Blood serum, seminal plasma and sperm membrane protein profiles in stallions: Are they correlated to semen freezability? *Ani. Reprod. Sci.* 64, 64-66.

7. ARTIGO 2

Trabalho a ser enviado para a revista **Animal Reproduction Science** (normas de publicação especificadas no Anexo III).

Influencia da adição de plasma seminal de animais de alta e baixa fertilidade na criopreservação de espermatozoides do ejaculado e da cauda do epidídimo de garanhões subférteis

Monteiro, G. A.¹, Ramires-Neto, C.¹, Sancelir-Silva, Y. F. R.¹, Freitas-Dell'Aqua, C. P.¹, Hartwig, F. P.¹, Papa, P.M.¹, Pantoja, J.¹, Papa, F. O.¹

¹*Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu, SP 18610-970, Brazil*

Resumo

Apesar dos benefícios proporcionados durante a cobertura, o plasma seminal tem sido reportado como deletério à preservação espermática. Muitos estudos têm questionado a necessidade do plasma seminal no processo de fecundação, já que espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo sem contato com plasma seminal apresentaram alta taxa de concepção. Neste sentido, o objetivo do presente estudo é comparar o efeito da adição de plasma seminal de garanhões de alta e baixa fertilidade sobre a congelabilidade e viabilidade dos espermatozoides do ejaculado (EJ) e recuperados da cauda do epidídimo (EP) de garanhões subférteis. As avaliações das amostras seminais consistiram na análise computadorizada das características da motilidade (CASA, Thorne Research - HTM IVOS) e nas análises de citometria de fluxo da integridade da membrana plasmática, da integridade acrossomal, da peroxidação das membranas espermáticas, da fragmentação do DNA, da capacitação espermática e da translocação de fosfatidilserina da membrana. Os resultados deste estudo demonstram que as secreções provenientes das glândulas anexas no momento da ejaculação são deletérias à

qualidade espermática de garanhões subfêrteis após criopreservação, afetando principalmente viabilidade da membrana plasmática, acrossoma e DNA dos espermatozoides. Além disso, foi constatado que a adição de 20% de plasma seminal de animais férteis e subfêrteis previamente à congelação dos espermatozoides da cauda do epidídimo não prejudicou a qualidade espermática.

Palavras-chave: criopreservação; cauda do epidídimo; espermatozoides; subfertilidade; plasma seminal, sêmen, equino.

1. Introdução

À medida que os espermatozoides passam pelo epidídimo eles sofrem importantes alterações morfofuncionais (Barth and Oko, 1989). O efeito fisiológico da aquisição de macromoléculas neste trajeto não é completamente elucidado, mas é requerido para o desenvolvimento de motilidade e capacidade fecundante (Jones, 1998). Esta hipótese é sustentada por estudos que apresentaram melhores taxas de fertilização, utilizando espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo quando comparado a amostras colhidas da cabeça e do corpo (Young, 1931; Orgebim-Crist, 1969; Holtz and Smidt, 1976).

Após a maturação, os espermatozoides são armazenados na cauda do epidídimo e ao serem ejaculados sofrem diversas transformações na membrana devido ao contato com a secreção proveniente das glândulas acessórias (Boué et al., 1996).

O plasma seminal corresponde a um fluido produzido pela rede testis, epidídimo e glândulas acessórias. Este fluido é expelido em frações durante a ejaculação e tem a função de transportar e fornecer substratos metabólicos para os espermatozoides, além de participar do processo de maturação espermática (Troedsson et al., 2005). Entretanto o efeito da adição do plasma seminal ao sêmen é contraditório tendo em vista a grande

variabilidade na composição bioquímica deste fluido entre garanhões (Aurich et al., 1996; Zahn et al., 2006; Almeida, 2006; Love et al., 2010).

Diversos estudos têm questionado a necessidade do plasma seminal no processo de fecundação, já que muitos trabalhos utilizando espermatozoides da cauda do epidídimo, que não possuem contato com estas secreções, foram capazes de fertilizar o ovócito (Blash et al., 2000; Yu and Leibo, 2002; Papa et al., 2008; Monteiro et al., 2011a; Monteiro et al., 2011b). Adicionalmente, algumas pesquisas relataram que o plasma seminal pode causar prejuízos relacionados à fertilidade e congelabilidade espermática (Moore and Hibbit, 1976; Aurich et al., 1996).

Monteiro et al. (2011a) constataram superioridade dos parâmetros de cinética e morfologia espermática de espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo quando comparados a espermatozoides do ejaculado de garanhões. Com isso, sugeriram haver um efeito deletério do contato dos espermatozoides com a secreção proveniente das glândulas acessórias durante o processo de ejaculação. Esse efeito está possivelmente relacionado às alterações bioquímicas ocasionadas por proteínas presentes no plasma seminal, que podem aumentar a permeabilidade da membrana e promovem injúria celular (Moore and Hibbit, 1976; Moustafa and Mezanos, 1981).

Neste sentido, o objetivo do presente estudo foi comparar o efeito da adição de plasma seminal proveniente de garanhões de alta e baixa fertilidade sobre a congelabilidade e viabilidade dos espermatozoides do ejaculado (EJ) e recuperados da cauda do epidídimo (EP) de garanhões subfêrteis.

2. Material e métodos

Foram utilizados seis garanhões de diferentes raças (três Mangalargas Paulista, dois Mangalargas Machador e um Lusitano) entre 5 a 10 anos de idade com histórico de

subfertilidade, apresentando parâmetros de motilidade total e progressiva menor que 50% e 25%, respectivamente.

Inicialmente, três ejaculados de cada garanhão foram coletados com intervalo de 2 dias com objetivo de eliminar possíveis células degeneradas da cauda do epidídimo, ducto deferente e ampola, visando estabilizar os parâmetros espermáticos. Os seis animais foram utilizados nos grupos 1 (EJ) e 2 (EP), sendo assim seus próprios controles.

No Grupo 1 (EJ), foram coletados, com intervalo de uma semana, dois ejaculados de cada garanhão utilizando vagina artificial. Após a retirada da fração gelatinosa a amostra seminal foi diluída na proporção 1:1 (v/v) com o diluente Botu-Sêmen^{®7} e dividida em três alíquotas, as quais foram acrescidas de 20% (v/v) com os seguintes meios: Botu-Semen[®] (EJ-CT); plasma seminal de garanhões com alta qualidade espermática (EJ-PS1); plasma seminal de garanhões com baixa viabilidade espermática (EJ-PS2). Todas as amostras foram incubadas por 15 minutos a 37°C e posteriormente centrifugadas a 600xg por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o “pellet” ressuspenso com o diluente Botu-Crio^{®8} na concentração de 100 milhões de espermatozoides totais por mL.

⁷ Botupharma Ltda, Botucatu, Brasil.

⁸ Botupharma Ltda, Botucatu, Brasil.

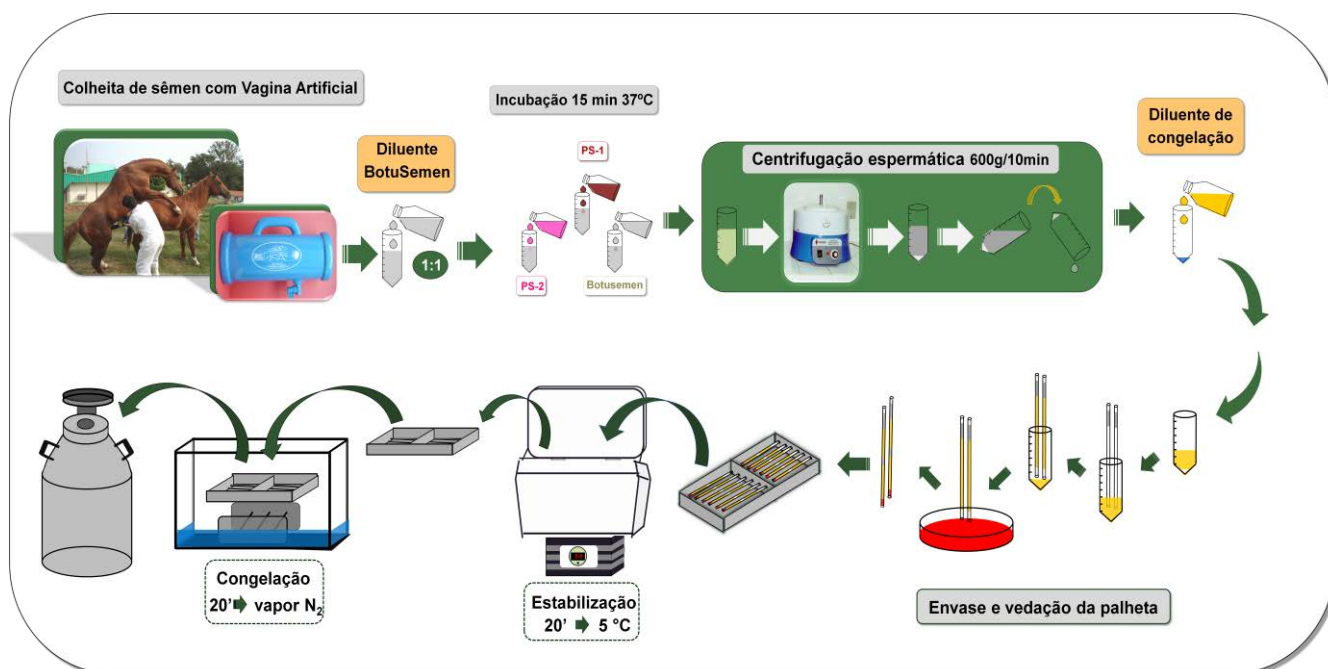


FIGURA 1: Esquema da congelamento dos espermatozoides do ejaculado.

Após o envase, as palhetas de 0,5 mL, foram colocadas em geladeira Minitub^{®9} e permaneceram a temperatura de 5°C por 20 minutos. Posteriormente, foram acondicionadas em caixa isotérmica com capacidade de 45 litros, preenchida com nitrogênio líquido até a marca de 3,5 cm de altura. As palhetas ficaram dispostas horizontalmente a 6,0 cm do nível do nitrogênio líquido por 20 minutos, e após este período, foram imersas no mesmo, como demonstrado na figura 1.

Uma semana após a última colheita de sêmen com vagina artificial, os garanhões foram submetidos à orquiectomia bilateral. Imediatamente após o procedimento realizou-se a colheita dos espermatozoides da cauda do epidídimo pela técnica de fluxo retrógrado descrita por Garde et al. (1994). Baseado nesta técnica o tecido conjuntivo que recobre o epidídimo foi removido e os contornos do ducto epididimário da cauda do epidídimo foram desfeitos. Em seguida o ducto epididimário foi lavado injetando o diluyente (Botu-sêmen[®]) no lúmen do mesmo, fazendo com que os espermatozoides fossem carregados pelo diluyente (Figura 2 e 3).

⁹ Minitub do Brasil LTDA.

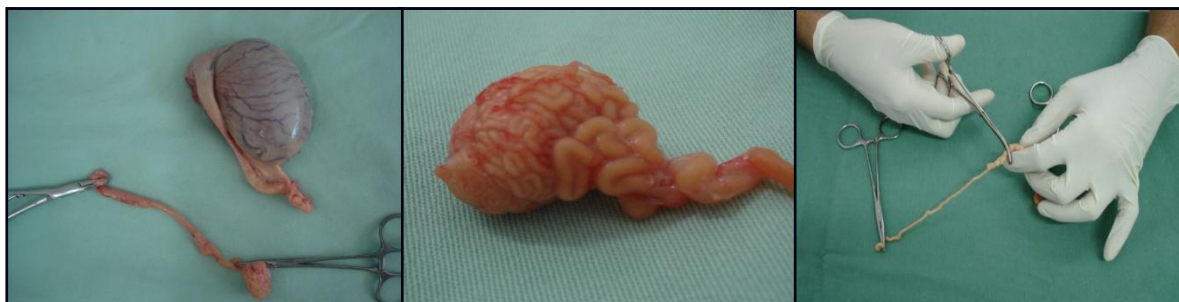


FIGURA 2 – Etapas que antecedem a recuperação de espermatozoides pela técnica de fluxo retrógrado consistem na: separação do complexo testículo-epidídimo; remoção do tecido conjuntivo que recobre a cauda do epidídimo; dissecação do tecido conjuntivo entre o ducto epididimário diminuindo os contornos da cauda do epidídimo.

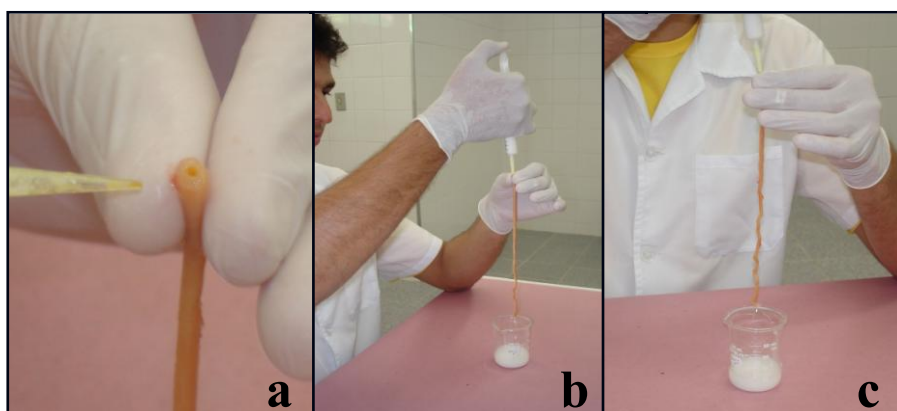


FIGURA 3 – recuperação de espermatozoides do epidídimo pela técnica de fluxo retrógrado: após a secção do ducto da cauda do epidídimo o mesmo foi estendido na posição vertical e o diluente foi injetado no lúmen até a outra extremidade (a,b,c).

No Grupo 2 (EP), após a recuperação dos espermatozoides do epidídimo as amostras seminais foram diluídas até atingir a concentração de 80 milhões por mL com o diluente Botu-Sêmen^{®10}. Posteriormente a amostra seminal foi dividida em três grupos e cada grupo acrescido de 20% (v/v) com os seguintes meios: Botu-Semen[®] (EP-CT); plasma seminal de garanhões com alta qualidade espermática (EP-PS1); plasma seminal de garanhões com baixa viabilidade espermática (EP-PS2). Após adição as amostras foram incubadas por 15 minutos a 37°C. A congelação dos espermatozoides do epidídimo após a colheita seguiu o mesmo protocolo descrito para a congelação do sêmen do ejaculado (EJ), como demonstrado na figura 4.

¹⁰ Botupharma Ltda, Botucatu , Brasil.

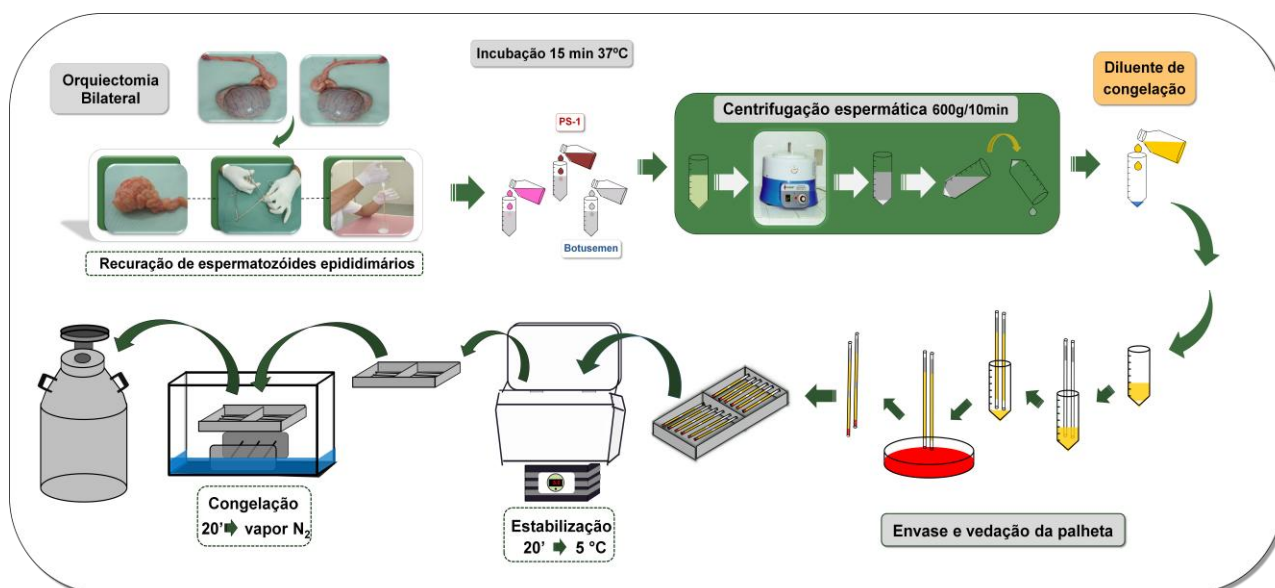


FIGURA 4: Esquema do processamento dos espermatozoides do epidídimo.

2.1 Preparação das amostras de plasma seminal

Para a colheita de plasma seminal foram utilizados 6 garanhões subfêrteis no grupo de baixa qualidade seminal (sêmen fresco com motilidade total <50% e fertilidade <20%) e 6 garanhões férteis no grupo de alta qualidade seminal (sêmen fresco com motilidade total >80% e fertilidade >80%). Após a colheita do sêmen com vagina artificial, o ejaculado foi centrifugado em tubos plásticos de 15mL a 1000xg por 15 minutos, repetindo o procedimento por 3 vezes, trocando-se o frasco sem ressuspensão do pellet. O sobrenadante final foi envasado em criotubos e congelados em freezer a -20°C. Previamente à adição do plasma seminal aos espermatozoides, as amostras de plasma seminal foram mantidas em Banho-Maria até atingir a temperatura de 37°C e somente neste momento foram adicionadas aos espermatozoides.

2.2. Análise das amostras

2.2.1 Análise computadorizada do movimento espermático (CASA) e integridade de membrana plasmática por microscopia de epi-fluorescência

Os espermatozoides coletados com vagina artificial e da cauda do epidídimo foram avaliados pelo método computadorizado – CASA imediatamente após a incubação (M0), após centrifugação e ressuspensão com o diluente de congelação (M1), imediatamente após a descongelação (M2) e após manutenção das amostras descongeladas à 20°C por 4 horas (M3) e 8 horas (M4). Para isso as amostras foram descongeladas a 46°C por 20 segundos (Dell'Aqua Jr. et al., 2001) e foram mantidas até 8 horas a 20°C.

Em todos os momentos a cinética espermática foi avaliada através do sistema Hamilton Thorne Research (HTM IVOS, Beverly, MA, USA) quanto aos parâmetros: porcentagens de espermatozoides com motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP) espermatozoides rápidos (RAP), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$) e velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$). Uma alíquota de cada grupo foi destinada à análise de integridade de membrana plasmática (IMP) por microscopia de epi-fluorescência (Leica Microsystem – DMLB, Ernst-Leitz-Strabe, Wezlar Germany) usando 20 μL de 6-Diacetato de carboxifluoresceína (concentração, 0.46 mg/mL) e 10 μL de iodeto de propídio (0.5 mg/mL) (Harrison and Vickers, 1990).

2.2.2 Análises por citometria de fluxo

As análises de citometria de fluxo foram realizadas no sêmen após a descongelação das palhetas à 46°C por 20 segundos (Dell'Aqua Jr, et al., 2001). Para estas análises foi utilizado o equipamento BD LSR Fortessa (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) equipado com lasers: azul 488-nm, 100 mW, vermelho 640-nm, 40 mW e violeta 405-nm, 100 mW. Após a análise, os dados foram arquivados para posterior avaliação através do software FACSDivatm software V6,2.

- Avaliação da integridade da membrana plasmática e acrossomal

Para a avaliação de integridade das membranas plasmática e acrossomal foram utilizadas as sondas iodeto de propídio (IP; P4170, Sigma) e FITC-PSA (L-0770, Sigma) de acordo com protocolo desenvolvido por Arruda et al. (2003), acrescido da adição de Hoechst 33345 (14533, Sigma) de acordo com Freitas-Dell'Aqua (2011). Assim, em uma amostra de 100 μL de sêmen diluído em TALP na concentração de 10×10^6 espermatozoides/mL foram adicionados 5 μL de IP (50 $\mu\text{g/mL}$) e 0,5 μL de FITC-PSA (1 mg/mL) e 5 μL de Hoechst (100 $\mu\text{g/mL}$), e então homogeneizados e incubados por 10 minutos a 37°C por 10 minutos, após a incubação foi acrescido 400 μL de TALP para um leitura de 500 a 600 eventos por segundo.

- Avaliação da peroxidação das membranas espermáticas

Este ensaio foi realizado utilizando a probe C11-BODYPY (D-3861; Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, EUA). Assim, em uma aliquota de 100 μL do sêmen diluído em TALP a uma concentração de 10×10^6 espermatozoides/mL foi acrescido mais 399,5 μL de TALP, para uma concentração de 1×10^6 espermatozoides e 0,5 μL da sonda C11BODIPY581/591 (1mg/mL - Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, EUA) por 20 minutos à 37°C. Após o período de incubação a amostra foi centrifugada a 300g por 5 min e ressuspendida para 500 μL , e então, foi adicionados 5 μL de IP (50 $\mu\text{g/mL}$) e 5 μL de Hoechst (100 $\mu\text{g/mL}$; Freitas-Dell'Aqua, 2011). A amostra foi novamente incubada por 10 minutos a 37°C. Para a avaliação da peroxidação das membranas espermáticas foram consideradas apenas as células com a membrana plasmática íntegra (IP-) e marcadas para peroxidação das membranas plasmáticas.

- Avaliação do índice da fragmentação do DNA

Esta análise foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Evenson (1986). Assim, em uma amostra de 100 μL de sêmen diluído, em solução tampão (0,186g de EDTA dissódico, 0,790g de Tris-HCl, 4,380g NaCl em 500 mL água deionizada, pH 7.4) na concentração de 1×10^6 espermatozoides/mL foram adicionados 400 μL de solução detergente ácida (2,19 g NaCl, HCl 1,0 mL de 2N solução, 0,25 mL Triton-X, em qsp. 250 ml de água deionizada, pH 1,8). A mesma foi incubada por 30 segundos e então foi acrescido 1mL de solução corante de laranja de acridina (AO; 3,8869 g de ácido cítrico mono-hidratado, 8,9429 g Na_2HPO_4 , 4,3850g NaCl, 0,1700g de EDTA dissódico, 4 $\mu\text{g/ml}$ de solução laranja de acridina – 1 mg/mL, em qsp. 500 ml de água, pH 6.0), a qual foi incubada por mais 30 segundo ao abrigo da luz. O índice de fragmentação de DNA (IFDNA) foi gerado a partir da análise de 10.000 células marcadas com laranja de acridina. Os dados gerados foram analisados pelo software WinList 6.0 (Verify software house). O IFDNA é a proporção, expressa em porcentagem do DNA do espermatozoide, do DNA fragmentado (fluorescência vermelha) dividida pela fluorescência total, ou seja, a soma do DNA fragmentado (fluorescência vermelha) com o DNA não fragmentado (fluorescência verde).

- Avaliação da capacitação espermática

Para esta análise em 100 μL de sêmen, previamente diluído em TALP na concentração de 10×10^6 espermatozoides por mL, foram acrescidos 900 μL de TALP para uma concentração de 1×10^6 espermatozoides, desta nova concentração 150 μL foram colocados em um tubo de 5mL, e então, foi adicionados 5 μL de IP (50 $\mu\text{g/mL}$) e 5 μL de Hoechst (100 $\mu\text{g/mL}$; Freitas-Dell'Aqua, 2011) e incubados por 10 minutos à 37°C. Após a incubação foi adicionado 5 μL do anticorpo antifosfotirosina (100 $\mu\text{g/mL}$ -

CLONE PY-20, F0426 – Sigma), previamente diluído em uma solução super saturada de O-Phospho-L-tyrosine (P9405, Sigma) de modo que a concentração final do anticorpo fosse 2 µg/mL, foi então acrescida a solução e incubada por mais 5 minutos nas mesmas condições. Para a avaliação da capacitação espermática foram consideradas apenas as células com a membrana plasmática íntegras (IP-) e marcadas com o anticorpo.

- Avaliação da translocação de fosfatidilserina da membrana

Para esta avaliação, foram utilizadas as sondas anexina V-APC (550475; Pharmingen) de acordo com as recomendações do laboratório, acrescido de Hoechst 33345 (14533, Sigma) de acordo com Freitas-Dell'Aqua (2011). Assim, 100 µL de sêmen diluído em TALP na concentração de 10×10^6 espermatozoides/mL foram adicionados em um tubo de cultura de 5 mL e, então, acrescido de 5 µL de anexina V-FITC e adicionados 5 µL de IP (50µg/mL) e 5 µL de Hoechst (100µg/mL) e 400 µL de solução tampão de anexina V (10 mM Hepes/NaOH – pH 7,4 – 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂). As amostras foram homogeneizadas e incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente. As células observadas durante a análise foram classificadas como células viáveis (An-/PI-), células viáveis com translocação fosfatidilserina (An+/PI-), células lesadas com fosfatidilserina translocação (An+/PI+), ou células mortas (An+/PI). O índice de translocação de fosfadidilserina foi calculado com base na relação entre o número de An+/PI-, e o número total de An-/PI- (Ricci et al., 2002).

2.4. Análise Estatística

Inicialmente a distribuição das variáveis foi analisada e as estatísticas descritivas foram produzidas para construir curvas de variação longitudinal para cada parâmetro

espermático. As variáveis MT e MP foram transformadas para a escala arco-seno para atingir normalidade.

Para as outras variáveis normalmente distribuídas (VAP e VSL), modelos de medidas repetidas (PROC MIXED, SAS Institute, 2009) foram usados para comparar a média de cada parâmetro espermático entre os tratamentos. Um termo de interação entre tratamento e momento foi incluído em todos os modelos para testar a hipótese de que a diferença entre tratamentos foi dependente do momento analisado. Uma estrutura de covariância auto-regressiva foi usada para modelar a correlação entre as medidas repetidas dentro do mesmo animal. O teste de Tukey foi usado para ajustar os valores-P resultantes de comparações múltiplas. Para os parâmetros RAP, IMP, PMAI, IA, ANEX, IFDNA, CAP e PER foi utilizado o teste de Wilcoxon (SAS PROC NPAR1WAY) para comparar a mediana de cada variável entre os grupos, dentro de cada momento. O nível de significância estatística foi definido $p < 0,05$.

3. Resultados

Tabela 1 - Valores médios e desvio padrão de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade angular progressiva (VAP), velocidade linear progressiva (VSL), espermatozoides rápidos (RAP) e integridade de membrana plasmática (IMP) dos espermatozoides do ejaculado (EJ-CT, EJ-PS1, EJ-PS2) e dos espermatozoides do epidídimo (EP-CT, EP-PS1, EP-PS2) de garanhões subfêrteis imediatamente após a incubação (M0).

Grupos	MT (%)	MP (%)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	RAP (%)	IMP (%)
EJ – CT	24,2 \pm 16,1	8,5 \pm 8,5	101,3 \pm 14,3	73,3 \pm 8,7	17,5 \pm 12,9	32,2 \pm 7,6 ^a
EJ – PS1	26,0 \pm 17,2	9,0 \pm 9,9	102,3 \pm 8,4	71,3 \pm 7,9	18,8 \pm 12,8	34,2 \pm 9,4 ^a
EJ – PS2	22,2 \pm 16,4	7,5 \pm 8,1	101,7 \pm 14,6	69,8 \pm 9,0	16,0 \pm 13,1	33,0 \pm 10,0 ^a
EP – CT	14,5 \pm 11,0	5,0 \pm 4,7	89,8 \pm 7,5	69,7 \pm 9,7	25,3 \pm 21,2	80,8 \pm 4,4 ^b
EP – PS1	28,0 \pm 24,2	13,0 \pm 14,5	92,3 \pm 14,2	75,3 \pm 10,0	20,5 \pm 22,6	79,0 \pm 9,2 ^b
EP – PS2	22,8 \pm 20,7	7,8 \pm 6,2	84,3 \pm 7,9	68,2 \pm 7,2	12,3 \pm 10,6	82,7 \pm 6,2 ^b

Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($p < 0,05$), CT= grupos incubados com 20% Botu-Sêmen, PS1= grupos incubados com 20% plasma seminal de garanhões com alta qualidade espermática, PS2 = grupos incubados com 20% plasma seminal de garanhões com baixa qualidade espermática.

Tabela 2 - Valores médios e desvio padrão de motilidade total (MT), motilidade progressiva (PM), velocidade angular progressiva (VAP), velocidade linear progressiva (VSL), espermatozoides rápidos (RAP) e integridade de membrana plasmática (IMP) dos espermatozoides do ejaculado (EJ-CT, EJ-PS1, EJ-PS2) e dos espermatozoides do epidídimo (EP-CT, EP-PS1, EP-PS2) de garanhões subfêrteis após centrifugação e ressuspensão com diluente de congelação (M1).

Grupos	MT (%)	MP (%)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	RAP (%)	IMP (%)
EJ – CT	34,2 \pm 19,3	11,3 \pm 10,1	87,5 \pm 17,0	66,3 \pm 11,8	25,3 \pm 21,2	30,8 \pm 13,4 ^a
EJ – PS1	32,8 \pm 23,0	10,3 \pm 9,2	83,7 \pm 14,2	64,0 \pm 10,9	22,0 \pm 21,8	31,3 \pm 13,4 ^a
EJ – PS2	36,5 \pm 21,6	11,2 \pm 9,7	82,5 \pm 17,8	62,5 \pm 10,8	23,7 \pm 18,4	28,7 \pm 13,2 ^a
EP – CT	71,2 \pm 16,1	23,7 \pm 12,8	93,2 \pm 19,4	69,2 \pm 12,1	51,7 \pm 23,4	73,1 \pm 8,9 ^b
EP – PS1	69,5 \pm 13,8	26,7 \pm 12,9	94,3 \pm 18,8	71,7 \pm 13,2	52,2 \pm 21,9	76,5 \pm 7,5 ^b
EP – PS2	68,0 \pm 19,0	22,8 \pm 1,8	94,5 \pm 24,0	70,2 \pm 16,0	49,5 \pm 28,7	78,5 \pm 10,7 ^b

Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($p < 0,05$), CT= grupos incubados com 20% Botu-Sêmen, PS1= grupos incubados com 20% plasma seminal de garanhões com alta qualidade espermática, PS2 = grupos incubados com 20% plasma seminal de garanhões com baixa qualidade espermática.

Tabela 3 - Valores médios e desvio padrão de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade angular progressiva (VAP), velocidade linear progressiva (VSL), espermatozoides rápidos (RAP) e integridade de membrana plasmática (IMP) dos espermatozoides do ejaculado (EJ-CT, EJ-PS1, EJ-PS2) e dos espermatozoides do epidídimo (EP-CT, EP-PS1, EP-PS2) de garanhões subfêrteis após descongelação (M2).

Grupos	MT (%)	MP (%)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	RAP (%)	IMP (%)
EJ – CT	16,3 \pm 15,1	7,5 \pm 8,5	75,8 \pm 22,9	66,2 \pm 15,3	10,2 \pm 11,4	15,2 \pm 4,8 ^a
EJ – PS1	9,7 \pm 10,0	4,2 \pm 6,3	77,2 \pm 23,4	67,5 \pm 24,4	5,5 \pm 7,6	12,0 \pm 4,5 ^a
EJ – PS2	13,8 \pm 9,8	5,7 \pm 6,6	74,7 \pm 17,5	63,3 \pm 14,4	7,8 \pm 8,1	13,3 \pm 5,3 ^a
EP – CT	29,7 \pm 8,8	10,7 \pm 8,0	76,3 \pm 12,1	64,3 \pm 10,4	15,5 \pm 9,2	32,1 \pm 7,7 ^b
EP – PS1	22,8 \pm 18,1	9,5 \pm 11,9	69,7 \pm 15,0	59,3 \pm 13,3	12,3 \pm 14,1	35,5 \pm 7,1 ^b
EP – PS2	24,2 \pm 13,9	8,8 \pm 9,2	71,2 \pm 14,3	60,2 \pm 12,2	12,1 \pm 11,1	34,1 \pm 7,3 ^b

Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($p < 0,05$), CT= grupos incubados com 20% Botu-Sêmen, PS1= grupos incubados com 20% plasma seminal de garanhões com alta qualidade espermática, PS2 = grupos incubados com 20% plasma seminal de garanhões com baixa qualidade espermática.

Tabela 4 - Valores médios e desvio padrão de integridade de acrossoma (IA), integridade de membrana plasmática e acrossoma íntegros (PMAI), índice de fragmentação de DNA (IFDNA), translocação de fosfolipídios de membrana (ANEX), capacitação espermática (CAP) e peroxidação das membranas espermáticas (PER) dos espermatozoides do ejaculado (EJ-CT, EJ-PS1, EJ-PS2) e dos espermatozoides do epidídimo (EP-CT, EP-PS1, EP-PS2) de garanhões subfêrteis após a descongelção (M2).

Grupos	IA (%)	PMAI (%)	IFDNA (%)	ANEX (%)	CAP (%)	PER (%)
EJ – CT	54,7±7,6 ^a	15,1±4,9 ^a	2,6±0,6 ^a	7,0±10,8	3,4±2,5	6.2±4.7
EJ – PS1	53,5±10,9 ^a	11,7±4,5 ^a	2,4±0,8 ^a	6,5±6,4	3,2±3,2	7.0±5.3
EJ – PS2	56,3±7,6 ^a	13,1±5,2 ^a	3,0±0,8 ^a	2,9±2,7	3,9±3,9	8.3±4.4
EP – CT	70,9±5,5 ^b	31,7±7,5 ^b	1,4±0,4 ^b	2,9±2,8	1,4±1,2	7.2±5.0
EP – PS1	72,5±4,5 ^b	35,2±7,0 ^b	1,2±0,3 ^b	2,1±1,1	1,6±0,9	8.7±5.5
EP – PS2	73,4±5,7 ^b	33,9±7,2 ^b	1,3±0,2 ^b	3,6±2,6	1,1±1,1	7.7±5.5

Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($p<0,05$), CT= grupos incubados com 20% Botu-Sêmen, PS1= grupos incubados com 20% plasma seminal de garanhões com alta qualidade espermática, PS2 = grupos incubados com 20% plasma seminal de garanhões com baixa qualidade espermática.

Tabela 5 - Valores médios e desvio padrão de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade angular progressiva (VAP), velocidade linear progressiva (VSL), espermatozoides rápidos (RAP) e e velocidade curvilínea (VCL) dos espermatozoides do ejaculado (EJ-CT, EJ-PS1, EJ-PS2) e dos espermatozoides do epidídimo (EP-CT, EP-PS1, EP-PS2) de garanhões subfêrteis, mantidos quatro horas a 20 °C após a descongelção (M3).

Grupos	MT (%)	MP (%)	VAP (µm/s)	VSL (µm/s)	RAP (%)
EJ – CT	15,7±14,3	6,3±7,8	80,8±16,1	64,0±11,3	10,0±10,4
EJ – PS1	7,8±6,7	1,8±2,4	67,3±12,3	45,8±22,7	3,5±3,5
EJ – PS2	13,8±8,7	4,5±3,4	64,0±11,3	63,5±8,0	7,2±5,1
EP – CT	28,0±17,8	10,2±10,7	82,8±15,8	65,3±9,7	18,7±16,7
EP – PS1	20,8±20,9	6,3±7,8	76,5±3,8	60,3±8,4	12,3±15,5
EP – PS2	23,7±20,1	7,7±8,2	77,3±15,4	62,0±9,6	15,5±15,1

Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($p<0,05$), CT= grupos incubados com 20% Botu-Sêmen, PS1= grupos incubados com 20% plasma seminal de garanhões com alta qualidade espermática, PS2 = grupos incubados com 20% plasma seminal de garanhões com baixa qualidade espermática.

Tabela 6 - Valores médios e desvio padrão de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade angular progressiva (VAP), velocidade linear progressiva (VSL), espermatozoides rápidos (RAP) e velocidade curvilínea (VCL) dos espermatozoides do ejaculado (EJ-CT, EJ-PS1, EJ-PS2) e dos espermatozoides do epidídimo (EP-CT, EP-PS1, EP-PS2) de garanhões subférteis, mantidos oito horas a 20 °C após a descongelção (M4).

Grupos	MT (%)	MP (%)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	RAP (%)
EJ – CT	5,7 \pm 4,3	1,3 \pm 1,5	69,5 \pm 13,4	54,7 \pm 8,3	3,0 \pm 2,3 ^{ab}
EJ – PS1	4,0 \pm 3,3	0,7 \pm 0,8	65,2 \pm 15,1	51,8 \pm 11,7	1,5 \pm 1,8 ^a
EJ – PS2	4,2 \pm 3,7	1,5 \pm 1,4	75,3 \pm 14,9	59,5 \pm 14,5	2,5 \pm 1,9 ^{ab}
EP – CT	22,7 \pm 18,7	7,3 \pm 7,1	82,8 \pm 15,8	65,0 \pm 8,2	15,2 \pm 15,1 ^{ab}
EP – PS1	13,5 \pm 10,2	7,0 \pm 6,9	80,7 \pm 14,2	65,0 \pm 13,0	7,5 \pm 5,8 ^b
EP – PS2	22,5 \pm 23,4	5,8 \pm 6,4	82,3 \pm 14,5	62,3 \pm 8,0	15,0 \pm 16,7 ^{ab}

Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($p < 0,05$), CT= grupos incubados com 20% Botu-Sêmen, PS1= grupos incubados com 20% plasma seminal de garanhões com alta qualidade espermática, PS2 = grupos incubados com 20% plasma seminal de garanhões com baixa qualidade espermática.

4. Discussão

Antigamente acreditava-se ser essencial a presença do plasma seminal no processo de fecundação. Contudo, pesquisas demonstram que espermatozoides provenientes da cauda do epidídimo, sem qualquer contato com plasma seminal, têm qualidade espermática e fertilidade igual ou superior aos espermatozoides do ejaculado (Tiplady et al., 2002; Monteiro et al., 2011b).

O efeito do plasma seminal sobre os parâmetros de cinética espermática pré e pós congelção foi investigado por inúmeros estudos (Braun et al., 1994; Tiplady et al., 2002; Heise et al., 2010; Heise et al., 2011), apresentando no entanto, resultados contraditórios. Alguns relataram efeito benéfico da adição de plasma seminal nas amostras do epidídimo sobre os parâmetros de cinética espermática (Braun et al., 1994; Tiplady et al., 2002), contudo outros relataram que o plasma seminal pode levar a

prejuízos à fertilidade e congelabilidade do sêmen (Moore and Hibbit, 1976; Moustafa and Meszaros, 1981).

No presente estudo não foi observada diferença nos parâmetros de cinética espermática entre espermatozoides do epidídimo com adição de 20% de plasma seminal (EP-PS1 e EP-PS2) e sem adição de plasma seminal (EP-CT). Estes achados são contraditórios aos reportados por Tiplady et al. (2002) avaliando espermatozoides recém coletados do epidídimo e por Neuhauser et al. (2013) que relataram um efeito estimulador quando o plasma seminal foi adicionado após a descongelação espermática. As diferenças do momento da adição, bem como as concentrações diferentes de plasma seminal, provavelmente contribuíram para resultados contraditórios entre os estudos. Além disso, a interação do plasma seminal com fatores do leite contidos no meio extensor pode influenciar os resultados (Mari et al., 2011). Por esse motivo, pode ser necessário colocar maiores concentrações de plasma seminal nas amostras para causar o efeito deletério.

No presente estudo as análises realizadas nos momentos M0 (Tabela 1), M1 (Tabela 2), M2 (Tabela 3) e M3 (Tabela 5), demonstraram similaridade nos parâmetros MT, MP, VAP e VSL dos espermatozoides do ejaculado (EJ-CT, EJ-PS1 e EJ-PS2) quando comparados aos recuperados da cauda do epidídimo (EP-CT, EP-PS1 e EP-PS2). Estes achados são compatíveis aos resultados obtidos em ganhões de alta congelabilidade espermática (Monteiro et al., 2011b) e divergem de resultados obtidos em ganhões subfêrteis por Monteiro et al. (2011a), que apresentaram inferioridade nos parâmetros MT, MP e RAP dos espermatozoides do ejaculado, antes e após descongelação espermática.

A avaliação realizada 8 horas após descongelação (M4 – tabela 6) também não apresentou diferenças nos parâmetros de MT, MP e VAP, contudo o número de

espermatozoides rápidos foi inferior no grupo EJ-PS1 em relação ao EP-PS2. Este resultado demonstra que os espermatozoides do epidídimo com 20% de adição de plasma seminal de garanhões férteis possuem número similar de espermatozoides rápidos aos espermatozoides do ejaculado nas mesmas condições.

Em relação à IMP, todos os grupos de espermatozoides do ejaculado apresentaram menor número de espermatozoides com membrana plasmática íntegra quando comparado aos espermatozoides do epidídimo nos momentos M0 (tabela 1), M1 (tabela 2) e M2 (tabela 3), corroborando com resultados encontrados por Monteiro et al., (2011b). Além disso, foi observado no presente estudo superioridade do número de espermatozoides com integridade de acrossoma (IA) e integridade de membrana plasmática e acrossoma (PMAI), sendo estes achados importantes para manutenção da capacidade fecundante do espermatozoide.

Os resultados de IMP, IA e PMAI indicam superioridade dos espermatozoides da cauda do epidídimo quando comparados aos do ejaculado (tabela 4). Esses resultados diferem de relatos anteriores de Monteiro et al. (2011b), que demonstram similaridade entre parâmetros dos espermatozoides do ejaculado e do epidídimo e de Heise et al. (2011) que observaram efeito positivo e significativo na adição de plasma seminal aos espermatozoides do epidídimo. Entretanto, diferente destes relatos anteriores, o presente estudo utilizou garanhões com histórico de subfertilidade apresentando baixa qualidade espermática, fato que provavelmente contribuiu para tais resultados contraditórios.

Esta hipótese é sustentada por relato anterior que demonstrou efeito deletério na viabilidade espermática com a adição do plasma seminal provenientes de garanhões de baixa congelabilidade (Aurich et al., 1996). Além disso, o estudo realizado por Monteiro et al. (2011a) demonstrou superioridade tanto nos parâmetros de cinética espermática quanto na morfologia espermática dos espermatozoides recuperados da

cauda do epidídimo de garanhões subfêrteis, em relação aos coletados com vagina artificial.

Após a descongelação foi constatado menor índice de fragmentação de DNA (IFDNA) nos grupos recuperados da cauda do epidídimo quando comparados aos do ejaculado (tabela 4). Resultado semelhante foi reportado por Love et al. (2005) que demonstraram haver aumento da fragmentação do DNA espermático quando há presença do plasma seminal no sêmen refrigerado de garanhões, fato que pode ocasionar redução da fertilidade.

Em relação a análise e capacitação espermática (tabela 4), não foi constatado diferenças entre espermatozoides do ejaculado e epidídimo. Estes achados contrastam com os relatados por Sostaric et al. (2010) que apresentaram valores mais elevados nos espermatozoides do ejaculado quando comparado aos recuperados do epidídimo.

A ausência de contato dos espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo com o plasma seminal pode ser uma causa dos melhores resultados dos parâmetros de IMP, IA e PMAI quando comparados aos do ejaculado. Esta hipótese é sustentada por estudos que relataram que a presença de proteínas contidas no plasma seminal pode promover alterações bioquímicas, levando a danos na membrana plasmática com prejuízos na fertilidade e congelabilidade espermática (Moore and Hibbit, 1976; Moustafa and Mezanos, 1981).

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que os espermatozoides do ejaculado sofrem uma interação deletéria ao terem contato com secreções das glândulas anexas no momento da ejaculação, levando a queda do número de espermatozoides com membrana plasmática e acrossoma íntegros após a descongelação. Além disso, os espermatozoides deste grupo apresentaram maior índice de fragmentação de DNA quando comparado aos recuperados da cauda do epidídimo. Entretanto, a adição de 20%

(v/v) de plasma seminal de garanhões de alta ou baixa viabilidade não causou efeito similar, pois não foi observada diferença entre os grupos com ou sem adição de plasma seminal, tanto nos espermatozoides do epidídimo quanto do ejaculado.

Apesar de alguns trabalhos avaliarem o efeito da adição de plasma seminal nos espermatozoides do epidídimo (Morris, 2002; Heise et al., 2010; Heise et al., 2011; Neuhauser et al., 2013), nenhum destes trabalhos avaliou a ação do plasma seminal de alta e baixa fertilidade nos espermatozoides do epidídimo e do ejaculado de garanhões subfêrteis.

5. Conclusão

Desta forma, os resultados deste estudo nos permitem concluir que a secreção proveniente das glândulas anexas no momento da ejaculação é deletéria à qualidade espermática após criopreservação de garanhões subfêrteis, afetando principalmente viabilidade da membrana plasmática, acrossoma e DNA dos espermatozoides. Além disso, foi constatado que a adição de 20% de plasma seminal de animais férteis ou subfêrteis previamente a congelamento dos espermatozoides da cauda do epidídimo não prejudicou a qualidade espermática.

6. Referências

Almeida, J.L, 2006. Efeito de diferentes concentrações de plasma seminal na criopreservação do sêmen equino. 16 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília.

Arruda, R.P., Ball, B.A., Gravance, C.G., Liu, I.K.M., 2003 Determinação da integridade da membrana plasmática e acrossomal de espermatozoides de garanhões pela técnica de citometria de fluxo. *A. Sci. Vet.* 31, 226-227.

Aurich, J.E, Kühne, A., Hoppe, H., Aurich, C., 1996. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. *Theriogenology* 46, 791-797.

Boué, F., Blais, J., Sullivan, R., 1996. Surface localization of P34H, an epididymal protein, during maturation, capacitation, and acrosome reaction of human spermatozoa. *Biol. Reprod.* 54, 1009-1017.

Barth, A.D., Oko, R.J., 1989. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Ames: Iowa State University Press 285p.

Blash, S., Melican, D., Gavin, W., 2000. Cryopreservation of epididymal sperm obtained at necropsy from goats. *Theriogenology* 54, 889-905.

Braun, J., Torres-Boggino, F., Hochi, S., Oguri, N., 1994. Effect of seminal plasma on motion characteristics of epididymal and ejaculated stallion spermatozoa during storage at 5 degrees C. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 101, 319-322.

Dell'aqua, J.A., Papa, F.O., Alvarenga, M.A., Zahn, F.S., 2001. Effects of warming rate on sperm parameters and of insemination site and dose on the fertility of equine frozen semen. *Anim. Reprod. Sci.* 68, 344-346.

Flaherty, C.O., Vaisheva, F., Hales, B.F., Chan, P., Robaire, B. 2008. Characterization of sperm chromatin quality in testicular cancer and Hodgkin's lymphoma patients prior to chemotherapy. *Hum Reprod*, p.1-9.

Garde, J., Aguado, M., Perez, S., Garrido, D., Perez-Guzman, M., Montoro, V., 1994. Physiological characteristics of epididymal spermatozoa from postmortem rams. *Theriogenology* 41, 2003.

Harrison, R.A.P., Vickers, S.E., 1990. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 88, 343-352.

Heise, A., Thompson, P.N., Gerber, D., 2011. Influence of seminal plasma on fresh and post-thaw parameters of stallion epididymal spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 123, 192-201.

Heise, A., Ahn, W.K., 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.

Holtz, W., Smidt, D., 1976. The fertilizing capacity of epididymal spermatozoa in the pig. *J. Reprod. Fert.* 46, 227-229.

Jones, R., 1998. Plasma membrane structure and remodeling during sperm maturation in the epididymis. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 53, 73-84.

Love, C.C., Brinsko, S.P., Rigby, S.L., Thompson, J.A., Blanchard, T.L., Varner, D.D., 2005. Relationship of seminal plasma level and extender type to sperm motility and DNA integrity. *Theriogenology* 63, 1584-1591.

Love, C.C., Thompson, J.A., Brinsko, S.P., Blanchard, T.L., Varner D.D. 2010. Effect of inter-stallion seminal plasma variability on motility, viability, and DNA integrity of cauda epididymal sperm. *Anim. Reprod. Sci.* 121, 191.

Mari, G., Castagnetti, C., Rizzato, G., Mislei, B., Iacono, E., Merlo, B. 2011. Density gradient centrifugation of sperm from a subfertile stallion and effect of seminal plasma addition on fertility. *Anim. Reprod. Sci.* 126, 96-100,

Monteiro, G.A., Papa, F.O., Guasti, P.N., Freitas, N.P.P., Melo, C.M., Avanzi, B.R., et al., 2011a. Fertility of epididymal cauda sperm from subfertile stallions. *Vet. Zootec.* 18, 255-63.

Monteiro, G.A., Papa, F.O., Zahn, F.S., Dell'aqua Jr, J.A., Melo, C.M., Maziero, R.R.D., et al., 2011b. Cryopreservation and fertility of ejaculated and epididymal stallion sperm. *Anim. Reprod. Sci.* 127, 197-201.

Moore, H.D.M., Hibbit, K.C.S., 1976 The binding of labeled basic proteins by boar spermatozoa. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 46.

Moore, I., Squires, E.L., Graham, J.K., 2005. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. *Theriogenology* 63, 2372-2381.

Morris, L., Tiplady, C., Allen, W.R., 2002. The in vivo fertility of cauda epididymal spermatozoa in the horse. *Theriogenology* 58, 643-646.

Moustafa, A.R., Mezaros, I., 1981. Interrelationship between the total protein content of bovine seminal plasma and behavior of spermatozoa after freezing-and-thawing, *Acta. Vet. Acad. Scient. Hung.* 4, 403-408.

Neuhauser, S., Rheinfeld, S., Handler, J., 2013. 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. *J. Equine Vet. Sci.* (in press).

Orgebin-Crist, M.C., 1969. Studies on the function of the epididymis. *Biol. Reprod.* suppl. 1, 155-175.

Papa, F.O., Melo, C.M., Fioratti, E.G., Dell'aqua, J.A., Zahn, F.S., Alvarenga, M.A., 2008. Freezing of stallion epididymal sperm. *Anim Reprod Sci.* 107, 293-301.

Ricci, G., Perticarari, S., Fragonas, E., Giolo, E., Canova, S., Pozzobon C., 2002. Apoptosis in human sperm: its correlation with semen quality and the presence of leukocytes. *Hum, Reprod.* 17, 2665-2672.

Sostaric, E., Kraan, H., Stout, T.A.E. 2010. Role of seminal plasma in the attainment of fertilizing capacity by stallion epididymal sperm. *Anim. Reprod. Sci.* 121, 194-185.

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.

Troedsson, M.H.T., Desvougges, A.S., Alghamdi, A.S., Dahms, B., Dow, C.A., Hayna, J., Valesco, R., Collahan, P.T., Macpherson, M.L., Pozor, M., Buhi, W.C., 2005. Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. *Ani. Reprod. Sci.* 89, 171-186.

Young, W.C., 1931. A study of the function of the epididymis. III Functional changes undergone by spermatozoa during their passage through the epididymis and vas deferens of the guinea pig. *J. Exp. Bio.* 8, 151-164.

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

Zahn, F.S., Papa, F.O., Melo, C.M., 2006. Blood serum, seminal plasma and sperm membrane protein profiles in stallions: Are they correlated to semen freezability? *Ani. Reprod. Sci.* 64, 64-66.

8. CONCLUSÕES

8. CONCLUSÕES

Artigo 1

Os espermatozoides do epidídimo após descongelação apresentaram superioridade nos parâmetros de cinética e viabilidade espermática, além de melhor fertilidade, demonstrando que estes espermatozoides são mais resistentes ao processo de congelação quando comparado aos espermatozoides do ejaculado.

O plasma seminal de garanhões subfêrteis apresenta maior concentração de sódio que nos garanhões férteis, sendo este achado uma possível forma de explicar o efeito deletério do plasma seminal nestes animais.

Artigo 2

A secreção proveniente das glândulas anexas no momento da ejaculação é deletéria à qualidade espermática após criopreservação de garanhões subfêrteis, afetando principalmente viabilidade da membrana plasmática, acrossoma e DNA dos espermatozoides.

Além disso, foi constatado que a adição de 20% de plasma seminal de animais férteis e subfêrteis previamente a congelação dos espermatozoides da cauda do epidídimo não prejudicou a qualidade espermática.

9. ANEXOS

ANEXO I

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

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

ANEXO II - PREPARO DAS SONDAS FLUORESCENTES

SOLUÇÃO DE ESTOQUE

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

1 - P 4170 - Sigma

2 - C 5041 - Sigma

SOLUÇÃO DE TRABALHO

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

ANEXO III - NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA ANIMAL REPRODUCTION SCIENCE.

Article structure

Manuscripts should have numbered lines with wide margins and double spacing throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc., should be numbered. However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary, one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- ***Title.*** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- ***Author names and affiliations.*** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses

(where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author.

• ***Corresponding author.*** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.**

• ***Present/permanent address.*** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title


or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Authors and editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the *International Code of Botanical Nomenclature*, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature*.

All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.

All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUB: Biochemical Nomenclature and Related Documents:  <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/> for further information.

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork***Electronic artwork****General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

⇒ <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please "save as" or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as "graphics".

TIFF: color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

DOC, XLS or PPT: If your electronic artwork is created in any of these Microsoft Office applications please supply "as is".

Please do not:

- Supply embedded graphics in your wordprocessor (spreadsheet, presentation) document;

- Supply files that are optimised for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to "gray scale" (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author*: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors*: both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors*: first author's name followed by "et al." and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: "as demonstrated (Allan, 1996a, 1996b, 1999; Allan and Jones, 1995).

Kramer et al. (2000) have recently shown"

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters "a", "b", "c", etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2000. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51-59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 1979. *The Elements of Style*, third ed. Macmillan, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 1999. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281-304.

Supplementary and multimedia data

Elsevier accepts electronic supplementary and multimedia data to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data are provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in

electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. Video files: please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your supplementary information. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

It is hoped that this list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal's Editor for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One Author designated as corresponding Author:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes) Further considerations
- Manuscript has been "spellchecked" and "grammar-checked"
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black and white versions of the figures are also supplied for printing purposes For any further information please visit our customer support site at <http://epsupport.elsevier.com>.