

THAÍS KIEVITSBOSCH

***CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE
EPIDÍDIMO DE GARANHÕES***

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado
à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, SP,
para obtenção do grau de médico veterinário

Preceptora: *Profa. adjunta Ana Liz Garcia Alves*

BOTUCATU-2011

THAÍS KIEVITSBOSCH

***CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE
EPIDÍDIMO DE GARANHÕES***

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado
à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, SP,
para obtenção do grau de médico veterinário

Área de concentração: Reprodução

Preceptora: *Profa. adjunta Ana Liz Garcia Alves*

Coordenador de estágios: *Profa. Titular Jane Megid*

BOTUCATU-2011

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

Kievitsbosch, Thaís.

Criopreservação de sêmen de epidídimo de garanhões / Thaís Kievitsbosch. – Botucatu [s.n.], 2011

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Ana Liz Garcia Alves

Capes: 50500007

1. Sêmen – Criopreservação. 2. Cavalo – Reprodução. 3. Testículos.

Palavras-chave: Criopreservação; Epidídimo; Garanhão; Sêmen.

Sumário

Resumo -----	04
<i>Abstract</i> -----	05
1 INTRODUÇÃO -----	06
2 REVISÃO DA LITERATURA -----	07
3 CONCLUSÃO -----	14
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	14

KIEVITSBOSCH, THAÍS. Criopreservação de sêmen de epidídimo de garanhões. Botucatu, 2011. 20p. Trabalho de conclusão de curso de graduação (Medicina Veterinária, Área de concentração: Reprodução
- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

RESUMO

Diante da posição de destaque que o Brasil ocupa no mercado equídeo devido ao tamanho e à qualidade do seu plantel, é indispensável o papel das biotecnologias da reprodução para assegurar a competitividade do país nesse patamar. A criopreservação do sêmen de garanhões gera inúmeras vantagens que incluem: o armazenamento por período indeterminado do material genético, melhor racionalização do uso devido ao maior número de doses obtidas por ejaculado, utilização de um animal superior mesmo após sua morte ou perda irreversível da capacidade reprodutiva, entre outros. Neste contexto, a criopreservação do sêmen de epidídimo tem se mostrado uma técnica bastante promissora na reprodução eqüina. A cauda do epidídimo de garanhões possui uma quantidade significativa de espermatozóides férteis, o que assegura uma grande reserva de células em casos de acidentes inesperados. Diversos estudos têm sido realizados utilizando-se a criopreservação de sêmen de epidídimo para que, em circunstâncias inesperadas os proprietários possam optar por uma colheita final de sêmen a fim de permitir a propagação de material genético de qualidade.

Palavras-chave: garanhão, sêmen do epidídimo, congelação

KIEVITSBOSCH, THAÍS. Cryopreservation of stallion epididymal sperm. Botucatu, 2011. 20p. Trabalho de conclusão de curso de graduação (Medicina Veterinária, Área de concentração: Reprodução

- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

ABSTRACT

It is a fact that Brasil has a featured position in the equine market due to the size and the high quality of its squad. To keep the competitiveness, the reproduction biotechnologies have a big and important role. The cryopreservation of stallion semen, for example, generates innumerable advantages, which includes: larger number of obtained doses, storing genetic material for undetermined time, using the semen of a good stallion even after its dead or any other event that makes both semen collection and mating impossible, etc.

In this context, the cryopreservation of epididymal sperm, has been seen as a promising technique in equine reproduction. The epididymal cauda has a significant quantity of fertile spermatozoa and this ensures a huge store of cells in cases of unexpected accidents, which can early interrupt with the reproductive life of a stallion.

Lots of studies are being developed using the cryopreservation of stallion epididymal sperm. These studies permit the propagation of high quality genetic material and make possible for the stallion owner to opt for a final semen collect in unexpected circumstances.

Key words: stallion, epididymal sperm, cryopreservation

1 INTRODUÇÃO

A morte repentina de garanhões, traumas e ferimentos graves que inviabilizem tanto a colheita de sêmen quanto a monta natural, interrompem a vida reprodutiva de um garanhão de forma precoce. Nestas circunstâncias, os proprietários podem optar por uma colheita final de sêmen, a fim de propagar o material genético de qualidade do garanhão, através da tentativa de obtenção de seus produtos.

Uma das formas de se preservar o material genético de animais terminais e mesmo dos já que vieram a óbito, é através da criopreservação de sêmen de epidídimo. Estudos em equinos demonstraram que estes espermatozóides são considerados viáveis por até 24 horas após a orquiectomia, à temperatura ambiente (Muradás et.al.,2006).

Sabe-se que a primeira prenhes utilizando-se sêmen congelado de eqüino foi constatada com o uso de sêmen de epidídimo (Barker and Gandier, 1957). Além disso, resultados positivos, contudo com baixas taxas de prenhes, foram obtidos utilizando-se sêmen de epidídimo após inseminação artificial (Morris et.al, 2002), injeção intracitoplasmática de sêmen (ICSI) (Herrera et.al. 2006), com sêmen fresco ou congelado. Recentemente, o uso do diluente Botu-crio® permitiu um incremento significativo nas taxas de fertilidade do sêmen congelado de epidídimo de garanhões (Melo et al, 2007).

Com o tempo, diferentes técnicas de colheita de sêmen e criopreservação foram desenvolvidas, mas poucas são as pesquisas que focam a obtenção e a congelação de sêmen de epidídimo de garanhões. A fertilidade comprovada deste tipo de sêmen na espécie eqüina mostra a importância de estudos voltados para protocolos de recuperação e criopreservação destes espermatozóides. Com isso, permite-se um melhor aproveitamento do sêmen e a propagação de material genético de qualidade.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ESPERMATOGÊNESE

A espermatogênese é o fenômeno no qual os espermatozóides são produzidos pelos túbulos seminíferos através do processo de divisão e diferenciação celular. O epitélio seminífero é composto basicamente por dois tipos celulares, sendo elas as células de Sertoli e as células germinativas em desenvolvimento (Johnson, et.al, 1997,Johnson et.al.,200). O processo de multiplicação e diferenciação das células germinativas nos estágios mais avançados de seu desenvolvimento ocorre simultaneamente às mudanças morfológicas e à expressão gênica nas células de Sertoli e Leydig (Anway et al,2003; Walker,2003).

As células de Sertoli sustentam as espermatogônias localizadas na porção basal do epitélio seminífero (Johnson et al,1997) e que, por meio de sucessivas mitoses, dão origem aos espermatócitos. Estes, após o fenômeno de meiose seguida de mitose, originam quatro espermátides, que posteriormente darão origem aos espermatozóides. Essa última etapa, conhecida como espermiogênese (Johnson et al, 2000), só ocorre após modificações progressivas nas espermátides.

Ao final do processo de espermatogênese os espermatozóides são finalmente liberados no lúmen dos túbulos seminíferos (Johnson et al,1997; Johnson et al,2000) , mas ainda imóveis e inférteis.

2.2 MATURAÇÃO ESPERMÁTICA

A maturação espermática, que se inicia na cabeça do epidídimo e segue pelo corpo até a cauda, envolve intensas alterações morfológicas e bioquímicas, garantindo a formação de espermatozóides aptos a reconhecer e fertilizar oócitos secundários no trato reprodutor da fêmea, permitindo que os espermatozóides adquiram motilidade progressiva bem como potencial para sobrevivência e para o sucesso na fertilização. Estas alterações resultam de interações entre espermatozóides e o microambiente epididimário (Gatti et.al., 2004; Urban et. al., 2009)

À medida que os espermatozóides passam pelo epidídimo eles sofrem alterações morfofuncionais importantes (Barth et al, 1989). O epidídimo é um órgão

alongado enovelado localizado na superfície do testículo. É dividido anatomicamente em três porções: a cabeça, responsável pela absorção de fluidos (Marengo,2008) e aquisição de motilidade progressiva pelos espermatozóides (Shivaji, 1988); o corpo, onde os espermatozóides adquirem capacidade fecundante e a cauda, responsável basicamente por armazenar e manter os espermatozóides maduros (Shivaji,1988).

Dacheux e Paquignon (1980) demonstraram um aumento da fertilidade à medida que os espermatozóides transitam da cabeça para a cauda do epidídimo. Em estudos realizados por Young; Orgebin-Crist e Holtz et al, obtiveram-se melhores taxas de fertilização ao usar sêmen obtido da cauda, quando comparado com amostras obtidas da cabeça e do corpo epididimário.

Em estudos desenvolvidos por Orgebin-Crist (1969), foi constatada a necessidade de interação com diversas substâncias em diferentes porções do epidídimo para que os espermatozóides adquiram capacidade fecundante. Para tal, os espermatozóides precisam apresentar características morfofuncionais normais, adquiridas em sua formação nos túbulos seminíferos e completadas com a sua passagem pelo epidídimo e contato com a secreção das glândulas anexas (Nishimune et al,1993). Além de adquirirem motilidade, os espermatozóides no epidídimo também sofrem estabilização da peça intermediária e do acrossoma (Barth et al, 1989).

A principal mudança morfológica pela qual o espermatozóide passa durante o trânsito pelo epidídimo, é a migração da gota citoplasmática, um remanescente de citoplasma associado com sêmen testicular. A gota migra da base da cabeça para o final da peça intermediária do flagelo e depois deixa o espermatozóide ainda dentro do fluido da cauda do epidídimo ou durante/após ejaculação. A necessidade da migração da gota citoplasmática é demonstrada pela correlação existente entre a queda da fertilidade e a presença da gota citoplasmática nos espermatozóides (Bonet et.al.,1992).

Além da migração da gota, existem outros fatores que influenciam na fertilidade do sêmen de epidídimo. A arquitetura da superfície dos espermatozóides depende do correto posicionamento de todos os seus componentes. Potanto, a perda de um destes componentes pode comprometer a formação ou a maturação correta de outras proteínas de membrana durante o trânsito no epidídimo, o que pode influenciar negativamente a fertilidade (Evans et.al., 2001; Nishimura et.al., 2001).

Embora algumas alterações individuais possam refletir na fertilidade do sêmen de epidídimo, este órgão possui uma quantidade significativa de células com capacidade de fertilização (Barker et.al., 1957; Johnson et.al., 1980). O que também comprova o

potencial fértil destas células é que casos de prenheses positivas, apesar das baixas taxas, bem como potros vivos, já foram produzidos através da inseminação artificial convencional (Barker and Gandier, 1957; Melo et.al., 2008; Morris et.al.,2002; Papa et.al., 2008), inseminação histeroscópica (Morris et.al., 2002) e injeção espermática intra citoplasmática (ICSI) (Rosati et.al., 2004).

Um dos fatores que provavelmente desanima os pesquisadores a realizar estudos sobre o assunto é que a variação entre o sêmen de diferentes garanhões é muito grande (Braun et.al.,1994; Aurich et.al., 1996; Stout et.al., 1999; Schulman et.al., 2001), já que, além dos fatores genéticos a qualidade do sêmen é dependente também da estação do ano, atividade sexual prévia e ambiente a que está exposto tanto o sêmen quanto o garanhão (Blottner et.al., 2001). Por isso, o sucesso da colheita e criopreservação é bastante desafiador.

2.3 INFLUÊNCIA DO PLASMA SEMINAL NA FERTILIDADE DO SÊMEN DE EPIDÍDIMO

Existem controvérsias no que diz respeito à fertilidade e à influência do plasma seminal sobre os espermatozóides do epidídimo, e neste sentido, estudos foram realizados a fim de tentar esclarecer quais os reais efeitos do plasma seminal sobre a fertilidade, bem como determinar quão férteis são os espermatozóides do epidídimo.

Para alguns autores, o que explicaria a baixa qualidade funcional do sêmen congelado de epidídimo seria a ausência do plasma seminal, visto que este é um componente natural do sêmen ejaculado. O plasma seminal exerce papel importante na motilidade, integridade de membrana e transporte pelo útero e sua ausência poderia ser deletéria às células (Aurich,1996; Katila, 2001). Sabe-se que em sua constituição há fatores decapacitantes e fatores protetores que conseguem, reversivelmente, inibir a capacitação espermática, evitando assim que a reação acrossômica ocorra precocemente e que esta venha impedir a fertilização (Oliphant et.al.,1985).

Seguindo este raciocínio, a adição de plasma seminal aumentaria a fertilidade dos espermatozóides do epidídimo após descongelação (Aurich et.al., 1996; Bruemmer et.al., 2002; Stout et.al., 1999).

Controversamente, outros estudos concluíram que não há efeito significativo do plasma seminal sobre a qualidade das células do epidídimo (Papa et al., 2008; Cary et.al., 2004; Morris et.al ., 2002; Tiplady et.al., 2002; Volkmann et.al., 2001).

O que possivelmente explica os resultados contraditórios são variações existentes nos métodos de processamento do sêmen de epidídimo em cada experimento.

Em suma, o que se pode concluir dos resultados obtidos, é que o plasma seminal aumenta as chances de concepção por influenciar positivamente na fertilidade das células do epidídimo, entretanto não é estritamente necessário para que a concepção seja atingida (Morris et.al., 2002; Melo et.al., 2008; Papa et.al, 2008).

Vale lembrar que a mesma variação existente entre diferentes garanhões quando se compara a motilidade das amostras ejaculadas, se repete quando comparamos esse parâmetro nas amostras epididimárias, e ambas as variações estão correlacionados (Braun et.al.,1994; Schulman et.al., 2001). Essa relação permitiu que Braun et. al. (1994) sugerissem que a congelabilidade dos espermatozóides eqüinos é determinada ao deixarem o epidídimo, antes de se misturarem com o plasma seminal.

Quanto à fertilidade in vivo do sêmen de epidídimo, as opiniões também divergem.

2.4 CRIORESISTÊNCIA DO SÊMEN DE EPIDÍDIMO

Estudos mostram que, comparado com o sêmen ejaculado, os espermatozóides obtidos do epidídimo são mais resistentes ao choque frio, tornando-os candidatos potencialmente melhor preparados para os processos de congelação e descongelação (James et.al., 2002). Apesar de existirem trabalhos com opinião contrária, Magistrini et al (1988) verificaram numa comparação direta com o espermatozóide ejaculado, que os obtidos do epidídimo possuem motilidade pós-descongelação superior.

2.5 FERTILIDADE DO SÊMEN DA CAUDA DO EPIDÍDIMO

O crescente aumento no interesse da preservação de espécies ameaçadas de extinção e de células espermáticas de animais de produção com alto valor genético é um dos responsáveis pela intensificação nos estudos dirigidos à recuperação e preservação de espermatozóides viáveis da cauda do epidídimo.

Diversas tentativas de criopreservação de sêmen de epidídimo já foram realizadas com sucesso (Brummer et.al., 2002; Cary et.al., 2004; Jimenez, 1987; Melo et.al., 2008; Neild et.al., 2006; Papa et.al., 2008; Tiplady et.al., 2002). E o que mais tem motivado os pesquisadores é um aumento progressivo nas taxas de concepção obtidas com a inseminação artificial após descongelação do sêmen de epidídimo. No primeiro experimento utilizando-se sêmen congelado de epidídimo de garanhões, somente uma

égua (14%) de sete inseminadas emprenhou (Barker and Gandier, 1957). Morris (2004) obteve recentemente, uma taxa de 45% de prenhez após inseminação histeroscópica com sêmen de epidídimo fresco na dose de 200×10^6 espermatozóides. Utilizando a mesma dose inseminante, mas de sêmen congelado de epidídimo, o autor obteve taxas de concepção de 18 e 8% quando as fêmeas foram inseminadas por histeroscopia ou através da inseminação convencional, respectivamente. Isso demonstra que é possível obter produtos de sêmen de epidídimo mesmo com baixas doses inseminantes.

Papa et.al. comprovaram a fertilidade do sêmen epididimário criopreservado de garanhões com a utilização do diluente Botu-Crio®, obtendo taxa de concepção de 66,6% em éguas inseminadas no ápice do corno uterino com 400×10^6 espermatozóides viáveis pré e pós inseminação. Resultado bastante importante e animador.

Em estudo realizado por Herrera et.al utilizando ICSI e em oócitos eqüinos maturados *in vitro*, não houve diferença na proporção de clivagem embrionária quando comparado o sêmen criopreservado da cauda do epidídimo ao sêmen fresco e criopreservado do ejaculado. Estes resultados mostram que o sêmen criopreservado da cauda do epidídimo pode ser utilizado com sucesso na ICSI.

Comparando-se o sêmen ejaculado fresco e congelado com sêmen de epidídimo exposto ao plasma seminal, as taxas de concepção obtidas foram similares (Heise et.al., 2008).

As técnicas de inseminação na extremidade do corno uterino e por histeroscopia tornaram-se bastante importantes no contexto do sêmen de epidídimo. Permitem melhorar a taxa de concepção (Morris et al, 2002, Morris et al, 2004) e, por requerirem menor número de espermatozóides por inseminação, permitem o melhor aproveitamento do sêmen oriundo de um garanhão de alto valor genético que possa vir a óbito.

2.6 TÉCNICA DE COLHEITA DE SÊMEN DA CAUDA DO EPIDÍDIMO

A colheita de sêmen da cauda de epidídimo de garanhões mostrou-se eficiente em recuperar células espermáticas (James et al, 2002, Morris et al, 2004 Muradás, et al, 2006, Herrera et al, 2006 e Papa et al, 2008,), sendo que, após o contato com o diluente, estes espermatozóides apresentam motilidade progressiva igual ou superior aos obtidos por colheita em vagina artificial, embora apresentem fertilidade inferior pós congelação e descongelação quando comparados com os espermatozóides do ejaculado.

Estudos realizados com sêmen de epidídimo de diversas espécies domésticas, incluindo felinos, caninos, caprinos, suínos, eqüinos e bovinos, relataram que, para a maioria das espécies em estudo, os testículos armazenados entre 4 e 5°C apresentam melhor viabilidade seminal quando comparados aos testículos mantidos à temperatura ambiente (James et al,2004). Este declínio da qualidade espermática quando os testículos se mantêm por mais de 24 horas à temperatura ambiente, pode ser explicado pelo fenômeno de envelhecimento e esgotamento metabólico dos espermatozóides, bem como pelo processo de degeneração tecidual pós morte. Sob temperaturas mais baixas é possível retardar a degeneração tecidual e diminuir o metabolismo dos espermatozóides, mantendo-os viáveis por mais tempo (Granemann, 2006).

O que já se obteve de evolução no processo de colheita e preservação do sêmen de epidídimo a partir de estudos desenvolvidos na área, permite concluir que para a obtenção dos espermatozóides, a técnica do fluxo retrógrado é a que melhor viabiliza a captação das células, num total de 15 a 20 bilhões de espermatozóides (Bruemmer, 2006) contra 4 a 5 bilhões de células obtidas pela técnica de flutuação (Cary et.al., 2004). Além disso, as amostras obtidas através do fluxo retrógrado não contêm outros tipos celulares, como por exemplo, hemáceas, o que também pode ser considerado como vantagem desta técnica (Martinez-Pastor et.al., 2006)

O fluxo retrógrado consiste em lavar o epidídimo e o ducto deferente em direção à cauda, que é seccionada em diferentes segmentos na sua porção final (Bruemmer, 2006). A lavagem é realizada fazendo-se pressão com auxílio de uma seringa até que os espermatozóides carreados pelo diluente extravasem pelo corte realizado entre o corpo e a cauda do epidídimo (40). Estudos demonstraram ser um método eficiente para a captação de espermatozóides do epidídimo (Tiplady et.al., 2002; Muradás et.al., 2006), dado importante e animador, visto que o número de células recuperadas da cauda do epidídimo de um garanhão é maior do que o recuperado numa única colheita com vagina artificial (Muradás et.al., 2006).

Granemann (9) descreveu a técnica modificada de fluxo retrógrado, que consiste em separar o complexo testículo-epidídimo, remoção dos tecidos que envolvem o epidídimo a partir da dissecação do tecido conjuntivo que recobre a cauda do epidídimo. Após desfazer os contornos dos ductos epididimários, este deve ser seccionado em três porções para facilitar a lavagem.

Para a obtenção dos espermatozóides do epidídimo o segmento deve ser estendido em posição vertical e o diluente injetado no lúmen até que os espermatozóides

sejam carreados pelo diluente e recuperados na outra extremidade. Com esta técnica a quantidade de espermatozóides obtidos da cauda do epidídimo foi superior quando comparado com os colhidos por vagina artificial (9).

Após a obtenção dos espermatozóides, é necessário submetê-los ao processo de centrifugação para a retirada do sobrenadante. A intensidade e o tempo empregados para esta etapa, e que representam danos mínimos às células e máxima recuperação de espermatozóides (87%) são de 600 X g por 10 minutos (Dell'Aqua Jr., 2000). Após centrifugação o sobrenadante é dispensado e o pellet é ressuspensionado com diluente de congelamento adequado.

Estudos procuraram estabelecer qual o melhor diluente para a criopreservação do sêmen de epidídimo de garanhões, e com este fim, três diluentes foram testados e comparados: Botu-Crio (Melo et.al., 2007), INRA-82 (Palmer, 1984) com 5% de glicerol e o EDTA-lactose com 5% de glicerol (Martin et.al., 1979). O diluente Botu-Crio foi o que apresentou melhores parâmetros de motilidade total e progressiva dos espermatozóides após descongelamento, comprovando sua eficácia em promover a melhoria na congelabilidade e fertilidade de sêmen congelado de garanhões.

Com o objetivo de determinar qual a melhor metodologia para a criopreservação de sêmen de epidídimo, Kievitsbosch et. al. compararam os diluentes Botu-turbo® e Botu-sêmen® para a obtenção dos espermatozóides através da lavagem do epidídimo, a melhor dose de congelamento entre 30, 50 e 100 X 10⁶ spz/mL, a congelamento das palhetas em máquina TK 4000 (curva de congelamento de - 40°C/min) e em caixas isotérmicas (sendo mantidas a 6 cm do nível líquido do nitrogênio durante 20 minutos e em seguida imersas no nitrogênio líquido-curva de congelamento de -15°C/min) e, a descongelamento do sêmen nas temperaturas de 37°C/30'', 46°C/20'' e 65°C/12''. Para avaliar os parâmetros de motilidade espermática, as amostras foram submetidas à análise computadorizada (CASA – HTM IVOS 12) e para a avaliação da integridade de membrana, fez-se uso de sondas fluorescentes (iodeto de propídeo e a carboxifluoresceína).

Os melhores parâmetros de motilidade total e progressiva e integridade de membrana foram obtidos quando o sêmen de epidídimo foi lavado com Botu-turbo®, congelado na máquina TK 4000 e descongelado à 37°C/30, independente da concentração utilizada.

3. CONCLUSÃO

Diante do exposto, é possível concluir que a criopreservação de sêmen de epidídimo de garanhões é uma importante e promissora alternativa que, em casos de acidentes inesperados, permite armazenar e utilizar a genética de um garanhão superior mesmo após a sua morte. As técnicas de colheita, transporte e congelação do sêmen de epidídimo já estão determinadas, o que facilita e efetiva a utilização deste material em circunstâncias específicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Anway MD, Li Y, Ravindranath N. Expression of testicular germ cell genes identified by differential display analysis. J andral, v. 24, p. 173-84,2003.
- 2) Aurich JE, Kühne A, Hoppe H, Aurich C. Seminal plasma effects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. Theriogenology v.46, p.791–797, 1996.
- 3) Barker, C.A., Gandier, S.C.C. Pregnancy in a mare resulting from frozen epididymal spermatozoa. Can. J. Comp. Med. V.21, p.47–51, 1957.
- 4) Barth AD, Oko RJ. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Ames: Iowa State University Press, 25 p,1989.
- 5) Blottner S, Warnke C, Tuchscherer A, Heinen V, Torner H. Morphological and functional changes of stallion spermatozoa after cryopreservation during breeding and non-breeding season. Anim Reprod Sci, v.65, p.75–88, 2001.
- 6) Bonet, S., Briz, M., Fradera, A., Egozcue, J. Origin, development and ultrastructure of boar spermatozoa with folded tails and with two tails. Hum. Reprod., v.7, p.523–528, 1992.

- 7) Braun J, Sakai M, Hochi S, Oguri N. Preservation of ejaculated and epididymal stallion spermatozoa by cooling and freezing. *Theriogenology*, v.41, p.809–818, 1994.
- 8) 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.
- 9) Bruemmer, J.M. Collection and freezing of epididymal stallion sperm. *Anim Reprod Sci*, v.22, p. 677-682, 2006.
- 10) Cary, J.A.; Madill, S.; Farnsworth, K.; Hayna, J.T.; Duoos, L. and Fahning, M.L. A comparison of electroejaculation and epididymal sperm collection techniques in stallion. *Can Vet J*, v.45, p.35-41; 2004.
- 11) Dacheux, J.L., Paquignon, M. Relations between the fertilizing ability, motility and metabolism of epididymal spermatozoa. *Reprod. Nutr. Dev.*, v.20, p.1085–1099, 1980.
- 12) Dell'aqua Jr., J. A. Efeito da centrifugação, tipos de envase e temperatura de descongelamento sobre os parâmetros espermáticos e índices de fertilidade relacionados com o local de deposição e concentração da dose inseminante do sêmen congelado equino. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2000.
- 13) Evans, J.P. Fertilin beta and other adams as integrin ligands: insights into cell adhesion and fertilization. *Bioessays*, v.23, p.628–639, 2001.
- 14) Gatti, J.L.; Castella, S.; Dacheux, F.; Ecroyd, H.; Métayer, S.; Thimon, V. and Dacheux, J.L. Post-testicular sperm environment and fertility. *Animal Reproduction Science*, v.82–83, p.321–339, 2004.

- 15) Granemann LC. Avaliação comparativa do sêmen eqüino colhido com vagina artificial e por lavado intraluminal da cauda do epidídimo pós orquiectomia. Dissertação. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2006.
- 16) Heise, A., Kühn, W., Volkmann, D.H., Thompson, P.N., Gerber, D., Influence of seminal plasma on fertility of fresh and frozenthawed stallion epididymal spermatozoa, *Animal Reproduction Science*, 2009.
- 17) Herrera C, Miragaya HM, Conde P, Hynes V, Losinno L, Quintans C, et.al. Intracytoplasmic injection of in vitro matured equine oocytes with frozen-thawed epididymal sperm. *Anim Reprod Sci.* v.94, p.299-302, 2006.
- 18) Holtz W, Smidt D. The fertilizing capacity of epididymal spermatozoa in the pig. *J Reprod Fertil.* V. 46, p. 227-29, 1976.
- 19) James AN, Green H, Hoffman S, Landry AM, Paccamonti D, Godke RA. Preservation of equine sperm stored in the epididymis at 4°C for 24, 48, 72, and 96 hours. *Theriogenology*, v.58, p.401–404, 2002.
- 20) James AN. Preservation of sperm harvested from the rat, caprine, equine and bovine epididymis. (Tese). Baton Rouge: Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College; 2004.
- 21) Jasko, D.J. Procedures for cooling and freezing of equine semen. *ARS Vet.*, v.10, n.2, p.156-165, 1994.
- 22) Jimenez, C.F. Effects of Equex STM and equilibration time on the pre-freeze and postthaw motility of equine epididymal spermatozoa. *Theriogenology*, v.28, p.773-782, 1987.
- 23) Johnson, L.; Amann, R.P.; Pickett, B.W. Maturation of equine epididymal spermatozoa. *Am. J. Vet. Res.*, v.41 p.1190-6, 1980.

- 24) Jonhson, L., Blanchard TL, Varner DD, Strutchfield WL. Factors affecting spermatogenesis in the stallion. *Theriogenology*. v.48, p.1199-216,1997.
- 25) Jonhson L., Varner DD, Roberts ME, Smith TL, Keillor GE, Strutchfield WL. Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. *Theriogenology*, v. 60, p.471-80, 2000.
- 26) Katila T. Sperm-uterine interactions: a review. *Anim Reprod Sci*, v.68, p.267–272, 2001.
- 27) Kievitsbosch, T; Melo, C. M; Papa, F. O.; Magalhaes, L. C.; Martin, I.; Guasti, P. N.; Rocha, A. S; Dell 'Aqua Jr, J A. e Monteiro, G. A. Criopreservação de sêmen de epidídimo utilizando diferentes metodologias de congelação – dados não publicados, 2010.
- 28) Loomis PR, Squires EL. Frozen semen management in equine breeding programs. *Theriogenology*, v.64, p.480–91, 2005.
- 29) Magistrini M, Tinel C, Noue P, Palmer E. Correlations between characteristics of frozen spermatozoa from ejaculates or perfusates from epididymidis caudae and proximal deferent ducts in a group of stallions. *Proc 11th Intern Cong Anim Reprod*,1988
- 30) Marengo SR. Maturing the sperm: Unique mechanisms for modifying integral proteins in the sperm plasma membrane. *Anim Reprod Sci*, v.105, p. 52-63, 2008.
- 31) Martin, J.C., Klug, E., Günzel, A.R. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volumes straws. *J. Reprod. Fertil.*, v.27, p.47–51, 1979.
- 32) 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 epididymidis of Iberian red deer. *Theriogenology*, v.65, p.471–485, 2006.

- 33) Melo, C.M., Papa, F.O., Alvarenga, M.A., Dell'aqua Jr., J.A., Zahn, F.S., Orlandi, C., Martin, I. Semen storage for 24 h using different cooling. *J. Equine Vet. Sci.*, v.27, p.171–175, 2007
- 34) 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. and Alvarenga, M.A. Comparison of three different extenders for freezing epididymal stallion sperm. *Anim. Reprod. Sci.*, v.107, p.331, 2008.
- 35) Morris L, Tiplady C, Allen WR. The in vivo fertility of cauda epididymal spermatozoa in the horse. *Theriogenology*, v.58, p.643–646, 2002.
- 36) Morris, L.H.A. Low dose insemination in the mare: an update. *Animal Reproduction Science*, v.82-83, p.625-632, 2004.
- 37) Muradás, P.R., Weiss, R.R., Kozicki, L.E., Granemann, L.C., Santos, I.W., Pimpão, C.T. Alguns parâmetros de viabilidade de espermatozóides equinos colhidos por vagina artificial e por lavagem da cauda do epidídimo. (*Arch. Vet. Sci.*, v.11, p.69–74, 2006.
- 38) Neild, D., Miragaya, M., Chaves, G., Pinto, M., Alonso, A., Gambarotta, M., Losinno, L. and Agüero, A. Cryopreservation of cauda epididymis spermatozoa from slaughterhouse testicles 24 hours after ground transportation. *Anim. Reprod. Sci.*, v.94, p.92, 2006.
- 39) Nishimune Y, Okabe M. Mammalian male gametogenesis, growth, differentiation and maturation of germ cells. *Dev Growth Differ.* V.34, p.479-86, 1993.
- 40) Nishimura, H., Cho, C., Branciforte, D.R., Myles, D.G., Primakoff, P. Analysis of loss of adhesive function in sperm lacking cyritestin or fertilin beta. *Dev. Biol.*, v.233, p.204–213, 2001.

- 41) Oliphant, G., Reynolds, A.B. and Thomas, T.S. Sperm surface components involved in the control of the acrosome reaction. *Am. J. Anat.* V.174, p.269-283, 1985.
- 42) Orgebin-Crist MC. Studies on the function of the epididymis. *Biol Reprod* (Suppl. 1), p.155-175, 1969.
- 43) Palmer, E. Factors affecting stallion semen survival and fertility. In: *Proceedings of the 10th International Congress Animal Reproduction & AI 3* (377 Abstract), 1984.
- 44) Papa, F.O.; et al. Utilização do diluente MP50 para a criopreservação do sêmen equino. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*; v.26, n.3, p.184-187, 2002.
- 45) Papa, F.O., Melo, C.M., Fioratti, E.G., Dell'Aqua Jr, J.A., Zahn, F.S. and Alvarenga, M.A. Freezing of stallion epididymal sperm. *Anim. Reprod. Sci.*, v.107, p.293, 2008.
- 46) Rosati, I., Bebbere, D., Berlinguer, F., Leoni, G., Pintus, P.P., Succu, S., Ledda, S. and Naitana, S. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) of in vitro matured (IVM) equine oocytes with frozen/thawed epididymal spermatozoa. In: *Proceedings of the 15th International Congress on Animal Reproduction*, Porto Seguro, Brazil. p 428, 2004.
- 47) Schulman ML, Gerber D, Volkmann DH, Nurton J, Guthrie AJ, Joubert K. The effects of halothane anaesthesia on the cryopreservation of epididymal sperm in pony stallions (Abstract). *Anim Reprod Sci*, v.68, p.334–335, 2001.
- 48) Shivaji S. Seminal plasmin: a protein with many biological properties. *Biosci Reprod*, v.8 p.609-18, 1988.
- 49) Stout, T.A.E.; Morris L.H.A.; Li, X.; Allan, R.W. The effects of seminal plasma on motility and cryopreservability of horse epididymal sperm. In: *Proceedings of*

the Havermeyer Foundation Workshop: European Equine Gamete Group, p.5-6, 1999.

- 50) Tiplady CA, Morris LH-A, Allen WR. Stallion epididymal spermatozoa: pre-freeze and post-thaw motility and matozoa: viability after three treatments (Astract). Theriogenology, v.58, p.225–228, 2002.
- 51) Urban, S. O, Rinaldo, P.A.; Stumpp, T. Biologia epididimária: maturação espermática e expressão gênica. O mundo da saúde, São Paulo, 33(4):419-425, 2009.
- 52) Volkmann DH, Gerber D, Erb HN. Comparison between freezability of ejaculated and epididymal stallion sperm (Abstract). Anim Reprod Sci, v.68, p.340, 2001.
- 53) Walker WH. Molecular mechanisms controlling Sertoli cell proliferation and differentiation. Endocrinology, v.144, p. 3719-21, 2003.
- 54) Young WC. A study of the function of the epididymis. III functional hanges undergone by spermatozoa during their passage through the epididymis and vas deferens of the guinea pig. J Exp Biol. V.8, p.151-64, 1931.