

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE REPRODUÇÃO ANIMAL E RADIOLOGIA VETERINÁRIA

**CAPACIDADE DE LIGAÇÃO DOS ESPERMATOZOIDES
DO EPIDÍDIMO DE EQUINOS ÀS CÉLULAS DA TUBA
UTERINA CULTIVADAS *IN VITRO***

JOÃO ALEXANDRE MATOS CARNEIRO

BOTUCATU – SP
Junho 2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE REPRODUÇÃO ANIMAL E RADIOLOGIA VETERINÁRIA

**CAPACIDADE DE LIGAÇÃO DOS ESPERMATOZOIDES
DO EPIDÍDIMO DE EQUINOS ÀS CÉLULAS DA TUBA
UTERINA CULTIVADAS *IN VITRO***

JOÃO ALEXANDRE MATOS CARNEIRO

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

Orientador: Prof. Dr. José Antonio
Dell’Aqua Junior

BOTUCATU – SP
Junho 2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Carneiro, João Alexandre Matos.

Capacidade de ligação dos espermatozoides do epidídimo de equinos às células da tuba uterina cultivadas in vitro / João Alexandre Matos Carneiro. - Botucatu, 2014

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: José Antonio dell'aqua Junior

Capes: 50504002

1. Égua. 2. Espermatozóides. 3. Aderência celular. 4. Células - Adesão. 5. Semên. 6. Epidídimo. 7. Plasma seminal.

Palavras-chave: Adesão celular; Espermatozoide; Garanhão ; Plasma seminal.

Nome do Autor: João Alexandre Matos Carneiro

Título: **CAPACIDADE DE LIGAÇÃO DOS ESPERMATOZOIDES DO EPIDÍDIMO DE EQUINOS ÀS CÉLULAS DA TUBA UTERINA CULTIVADAS *IN VITRO*.**

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Antonio Dell'Aqua Junior

Orientador

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ- UNESP- Botucatu

Prof^a. Dra. Fabiana Ferreira de Souza

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ- UNESP- Botucatu

Prof. Dr. André Maciel Crespilho

Membro

Departamento de Reprodução Animal

Universidade de Santo Amaro - UNISA

Data da defesa: 18 de Junho de 2014

*Dedico essa dissertação aos meus pais, **José Almeida e Margarida Matos**, que com muito amor e carinho, fazem de mim uma pessoa melhor. Meus irmãos, familiares e amigos pelo apoio em todos os momentos da minha vida.*

*Ao meu orientador, **José Antonio Dell'Aqua Junior**, pela confiança em minha capacidade além da paciência e incentivo a realização desta obra.*

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me ofertado a chance de alcançar o que escolhi ser, acima de tudo e por todas as maravilhas que Ele tem feito em minha vida.

Aos meus pais, José Almeida e Margarida, por todo amor incondicional, carinho, respeito, confiança e admiração que sempre demonstraram por mim. Por terem me apoiado e por muitas vezes se sacrificado para me dar tudo o que precisei. Amo vocês!

Aos meus irmãos Danilo Miguel e José Arthur, as cunhadas Paula Borges e Waldete Japiassu, pelo apoio emocional ao longo desses anos. Muito obrigado pelo carinho, sempre me ajudando na superação das dificuldades.

Aos meus sobrinhos Malu, Miguel e Yasmin por me fazerem muito feliz, me agradando com amor puro e inocente, servindo de incentivo e encorajamento para continuar minha busca.

À minha família (avós, tios, tias, primos e primas) por todo incentivo, atenção e carinho ofertados a mim durante todos esses anos.

À Fernanda Oliveira pela força, paciência, carinho, apoio e conforto nos momentos mais difíceis. Por me conceder sua família maravilhosa, você é muito importante para mim!

Aos meus tios, Marcos Soledade e Helio Dórea, pelo amor, confiança, amizade, por acreditarem em mim e me estimularem a ser uma pessoa melhor. Vocês são duas figuras paternas que levo no meu coração a todo o momento.

Aos amigos baianos e “botucudos” em geral: Ilha Quadrada, CERAN, Casas Bahia, Luiz Fernando Novaes, Fernanda Saules, Yamê Fabres, Gabriel Monteiro, pela força e por tornarem os meus dias mais fáceis e felizes.

Agradeço ao Prof^o Frederico Ozanam Papa e Prof^a Fernanda da Cruz Landim, pelos ensinamentos e paciência. Muito obrigado por tudo.

Agradeço ao meu orientador José Antonio Dell’Aqua Junior e sua esposa Camila De Paula Freitas Dell’Aqua, pela confiança e credibilidade ofertados durante esses anos. Obrigado pela oportunidade.

Aos funcionários da UNESP-Botucatu, especialmente aos do Departamento de Reprodução Animal e Secretaria de Pós-Graduação, por toda ajuda, amizade e confiança, vocês foram fundamentais para a realização dessa dissertação.

Obrigado a todos os professores da Universidade Estadual de Santa Cruz - Ilhéus-BA, pela minha formação, em especial: Roberta Dias, Amauri Wenceslau, Paola Snoeck, Eduardo Gomes, George Rego, Marcel Teixeira, muito obrigado por todos os ensinamentos, carinho e respeito ofertados a mim durante todos esses anos!

Aos meus amigos da UESC: Murilo, Amanda, Igor, Diego, e todos os outros que, de alguma forma, me incentivaram e fizeram parte da minha trajetória.

À um amigo (irmão) e toda a sua família que, de forma fraternal, sempre me incentivaram e comemoraram comigo a cada objetivo alcançado.

Agradeço à FAPESP pelo apoio fornecido em forma de bolsa e auxílio financeiro.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para a elaboração e sucesso deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	1
Abstract	2
CAPÍTULO I - REVISÃO DE LITERATURA	3
1 - INTRODUÇÃO	4
2 - REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1- Espermatogênese	5
2.2- Maturação espermática durante o trânsito epididimário	7
2.3- Plasma Seminal	8
2.3.1- Principais Componentes do Plasma Seminal	9
2.3.1.1- Proteínas	9
2.3.1.2- Enzimas	11
2.3.1.3- Hormônios	12
2.3.1.4- Ions	12
2.4- Transporte espermático	13
2.5- Espermatozoides provenientes do epidídimo x ejaculado	14
2.6- Reservatório espermático na tuba uterina	16
3 - CONSIDERAÇÕES FINAIS	19
REFERÊNCIAS	20
CAPÍTULO II - TRABALHO CIENTÍFICO - CAPACIDADE DE LIGAÇÃO DOS ESPERMATOZOIDES DO EPIDÍDIMO DE EQUINOS ÀS CÉLULAS DA TUBA UTERINA CULTIVADAS <i>IN VITRO</i>	32
NORMAS DAS REVISTAS	56

CARNEIRO, J.A.M. Capacidade de ligação dos espermatozoides do epidídimo de equinos às células da tuba uterina cultivadas *in vitro*. Botucatu, 2014. 75p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

Resumo

Muitas biotecnologias estão sendo desenvolvidas visando a conservação do material genético de animais de alto valor zootécnico. Dentre estas pode-se destacar a colheita de espermatozoides do epidídimo de animais que sofreram algum trauma ou enfermidade que impossibilitem a colheita do sêmen, óbito ou eutanásia. Porém essas células espermáticas não entram em contato com o plasma seminal, importante por conter proteínas que participam de processos relacionados à proteção e ligação dos espermatozoides aos reservatórios espermáticos na tuba uterina. Neste sentido, sugere-se que haja importantes alterações bioquímicas nas células espermáticas do epidídimo, objetivando-se assim com esta revisão, estudar as principais diferenças morfofuncionais entre os espermatozoides provenientes do epidídimo e do ejaculado.

Palavras-chave: espermatozoide, plasma seminal, adesão celular.

CARNEIRO, J.A.M. Capacity of binding from equine epididymis spermatozoa to the oviduct cells cultured in vitro. Botucatu, 2014. 75p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

Abstract

Several biotechnologies are being developed aiming genetic material conservation of stallions with high zootechnical value, as we can highlight the harvest epididymis's sperm of animals who suffered trauma or illness that makes impossible the semen collection, death or euthanasia. However these sperm cells do not get in touch with seminal plasma, important whereas it has proteins that participate in processes related to the protection and binding of sperm to the sperm reservoir in the oviduct. In this sense, it suggests that there is significant biochemical changes in epididymal sperm, aiming with this review to study the main morphological and functional differences between the sperm from the epididymis and ejaculated.

Keywords: spermatozoon, seminal plasma, cell adhesion.

CAPÍTULO I
REVISÃO DA LITERATURA

1.INTRODUÇÃO

De acordo com IBGE (2011), o Brasil conta com o quarto maior rebanho equino do mundo, com um plantel de 5,5 milhões de cabeças, o segundo maior rebanho bovino com um efetivo nacional de 212,8 milhões de cabeças, além de um crescimento considerável no rebanho dos animais de médio porte como caprinos, ovinos e suínos (9,3, 17,6 e 39,3 milhões de cabeças, respectivamente), sendo um dos países que mais gera produtos utilizando biotécnicas reprodutivas.

Esta produção tem estimulado o desenvolvimento de biotecnologias da reprodução visando a conservação de material genético de animais de alto valor zootécnico. Dentre estas, pode ser destacar a colheita de espermatozoides do epidídimo de reprodutores que sofreram algum trauma ou enfermidade que impossibilitem a colheita do sêmen, ou que tenham vindo a óbito ou eutanásia. Nestes casos, muitos proprietários têm buscado uma última recuperação do sêmen na tentativa de obter mais produtos com a genética valiosa daqueles animais.

Embora estudos recentes em equinos demonstrem um avanço significativo no que se refere à viabilidade dos espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo, os componentes moleculares dos espermatozoides, ou dos meios que os cercam, influenciam na capacidade de fertilização destas células. Frente a tal conceito, proteínas do plasma seminal modulam funções e processos cruciais da reprodução, como a motilidade, capacitação espermática, proteção celular, reação acrossômica e fertilização.

É conhecido que ao entrar em contato com o plasma seminal, os espermatozoides adquirem a capacidade de se aderir aos sítios de ligação dos reservatórios espermáticos na tuba uterina, pela combinação de uma série de fatores. Dentre estes, o edema da mucosa da tuba uterina associado à fase do ciclo estral levando a constrição localizada do istmo, redução da motilidade espermática no istmo, retenção dos espermatozoides no muco local e fixação às células epiteliais da tuba uterina (THOMAS et al., 1994).

In vitro, o reservatório espermático aumenta a viabilidade do espermatozoide equino (TROEDSSON et al., 1998). Pesquisas demonstraram que o reservatório espermático possui diferentes funções como a prevenção da capacitação espermática precoce, por manter em nível basal a concentração intracelular de

cálcio e redução do risco de poliespermia por liberar uma quantidade pequena e suficiente de espermatozoides para a fecundação no momento da ovulação (LEFEBVRE et al., 1995).

Porém a inseminação artificial com espermatozoides da cauda do epidídimo, os gametas não entraram em contato com o plasma seminal, podendo assim não adquirir essa capacidade de fixação no sítio de ligação na tuba uterina.

Embora os dados sobre as características de vários componentes bioquímicos do plasma seminal tenham sido publicados e progressos feitos especialmente no campo da proteômica, pouco se sabe a respeito da diferença de adesão dos espermatozoides provenientes do epidídimo e do ejaculado nos sítios de ligação dos reservatórios espermáticos, e até onde o plasma seminal é responsável por essa relação, na espécie equina.

Com base nessas informações e para melhor compreensão da fisiologia espermática, objetivou-se com essa revisão identificar as principais diferenças morfofuncionais entre os espermatozoides provenientes do ejaculado e do epidídimo, assim como sua interação nos sítios de ligação do reservatório espermático no oviduto.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Espermatogênese

O epitélio seminífero, delineando os túbulos seminíferos, é composto de dois tipos celulares básicos, as células de Sertoli e as células germinativas em desenvolvimento onde ocorre o início da formação dos espermatozoides (HAFEZ et al., 2004).

A espermatogênese é um processo altamente sincronizado e organizado onde células diplóides (espermatogônias) se diferenciam, pela meiose, numa célula haplóide madura (espermatozoide), dentro de um emaranhado de túbulos seminíferos que tem suas duas aberturas direcionadas para a *rete testis* e liberadas para o epidídimo e ducto deferente. Estes túbulos são compostos por células germinativas em diferentes graus de desenvolvimento, intercaladas e sustentadas por células de Sertoli, que se fixam na membrana basal e se estendem até o lúmen (VARNER & JOHNSON, 2007).

O processo se divide em três fases: a espermatocitogênese (fase de proliferação), a meiose (fase de multiplicação) e a espermiogênese (fase de diferenciação) (HAFEZ et al., 2004).

Durante a espermatocitogênese (fase de proliferação), as células germinativas mais jovens – as espermatogônias – se dividem em cinco gerações celulares (A1, A2, A3, B1 e B2). Durante esta fase, parte do citoplasma dessas células continua unido formando pontes intercelulares que são importantes por permitir a comunicação direta entre as células irmãs, garantindo o desenvolvimento sincronizado desta linhagem celular (JOHNSON et al., 1997; NEVES, 2001).

A seguir inicia-se a meiose (fase de multiplicação), caracterizada pela duplicação e troca de material genético por recombinação e duas divisões meióticas que dão origem a espermatídes arredondadas e haplóides (HAFEZ et al., 2004).

Na fase seguinte, espermiogênese (fase de diferenciação), as espermatídes arredondadas sofrem uma transformação severa com compactação da cromatina, formação do flagelo, do acrossoma e perdem citoplasma para, então, serem liberadas no lúmen do túbulo seminífero como espermatozoides, processo denominado de espermição. Durante esta fase as células são mais vulneráveis a defeitos estruturais e genéticos (AMANN, 1993; KERR et al., 2006).

No final do processo de espermatogênese os espermatozoides são liberados no lúmen dos túbulos seminíferos, porém necessitam sofrer o processo de maturação espermática no epidídimo e de capacitação no trato genital feminino para se tornarem aptos à fertilização (COSTA & PAULA, 2003).

O espermatozoide liberado pelo testículo, ao alcançar o epidídimo, ainda não possui habilidade de se movimentar, de reconhecer e fecundar o oócito, necessitando de transformações ao longo da passagem pelo epidídimo para potencializar a função de fertilização. Para alcançarem a cabeça do epidídimo os espermatozoides transitam pelos ductos eferentes, movimento realizado com o auxílio das células epiteliais ciliadas e pela contração da musculatura lisa das paredes dos ductos (BRANDT et al., 1978).

2.2 Maturação espermática durante o trânsito epididimário

O epidídimo é um órgão monotubular, disposto em espiral, que transporta os espermatozoides dos ductos eferentes aos deferentes (SULLIVAN et al., 2005). É considerado um segmento de grande importância na via espermática extra-testicular de mamíferos, possuindo como principais funções a maturação e estocagem dos espermatozoides (BEDFORD, 1966). Além disso, fornece um “ambiente bioquímico”, no qual o espermatozoide sofre mudanças fisiológicas e morfológicas, atingindo a maturação funcional ao passar pelas diversas regiões epididimárias (BEDFORD, 1975).

Essas mudanças funcionais envolvem alterações do padrão de atividade flagelar e habilidade de se ligar à zona pelúcida. Alterações na composição da membrana plasmática contribuem para estas mudanças funcionais, as quais são refletidas por mudanças na carga elétrica da superfície celular, ligação de lecitinas, distribuição de partículas intramembranas, fluidez da membrana, composição de lipídeos, proteínas e ligação de anticorpos (GATTI et al., 2004).

O espermatozoide, liberado pelos túbulos seminíferos, ao alcançar o epidídimo ainda não possui a habilidade de se movimentar (BARKER & AMANN, 1971). Esta habilidade e a capacidade fecundante dos espermatozoides são adquiridas no epidídimo durante o processo de maturação, que envolve alteração na membrana espermática, principalmente, do seu conteúdo proteico (YANAGIMACHI, 1994).

Anatomicamente, o epidídimo pode ser dividido em três segmentos; na cabeça do epidídimo o espermatozoide adquire motilidade; no corpo a habilidade de fecundação; e no segmento final, a cauda é o local de armazenamento. As células epididimais são especializadas em manter o ambiente para maturação espermática e realizar a proteção imunológica. Esta funcionalidade é baseada na manutenção do reduzido metabolismo, prevenindo a ativação prematura dos espermatozoides (SHIVAJI, 1988).

O volume da cauda do epidídimo reflete a capacidade de armazenamento de espermatozoides do macho. Em touros e garanhões o número de espermatozoides armazenados pode ser suficiente para até 10 ejaculados sucessivos dependendo da idade, tamanho e atividade reprodutiva do macho (BEDFORD, 1994).

Ao final do trânsito epididimário, os espermatozoides armazenados na cauda do epidídimo possuem capacidade de fertilização (PAPA et al., 2008; MONTEIRO et al., 2010). Tanto os eventos da espermatogênese quanto a maturação pós-testicular são necessários para a competência das células espermáticas frente à fertilização (GATTI et al., 2004).

Muitos pesquisadores intensificaram o estudo da recuperação e preservação de espermatozoides viáveis a partir da cauda do epidídimo. Isto ocorreu devido ao crescente interesse pela preservação de espécies ameaçadas de extinção e preservação de células espermáticas de animais de produção de alto valor genético, impossibilitados de realizar cobertura ou colheita de sêmen com vagina artificial ou eletroejaculador (TIPLADY et al., 2002; HERRERA et al., 2006; PAPA et al., 2008; MONTEIRO et al., 2010).

Tais estudos concentram-se no desenvolvimento e aprimoramento de técnicas de colheita de espermatozoides da cauda do epidídimo (CARY et al., 2004; BRUEMMER, 2006), comparação de meios diluentes (PAPA et al., 2008; MELO et al., 2008; GUASTI et al., 2009), refrigeração espermática (MONTEIRO et al., 2009), efeito da adição de plasma seminal (TIPLADY et al., 2002; MORRIS et al., 2002; MOORE et al., 2005; HEISE et al., 2010), viabilidade espermática de gametas subfêrteis (MONTEIRO et al., 2009), fertilidade (PAPA et al., 2008; MELO et al., 2008; HEISE et al., 2010), métodos de inseminação artificial (MORRIS et al., 2002) e injeção intracitoplasmática de espermatozoide (HERRERA et al., 2006).

2.3 Plasma seminal

O sêmen é composto por duas frações distintas: os espermatozoides, que compõem menos que 1% do volume total e o plasma seminal. O plasma seminal é uma mistura de fluido segregado a partir dos testículos, epidídimos e glândulas acessórias, responsável uma infinidade de funções e eventos que precedem a fecundação. Ao entrar em contato com o plasma seminal, os espermatozoides são revestidos com proteínas, enzimas, hormônios e íons secretados pelas glândulas sexuais acessórias do macho (WITE, 1988).

2.3.1 Principais componentes do plasma seminal

2.3.1.1 Proteínas

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

A secreção de proteínas no epidídimo é altamente regionalizada, sendo a cabeça e o corpo as regiões mais ativas. Na espécie equina, cerca de 73% dos compostos proteicos são secretados na cabeça do epidídimo (DACHEUX et al., 2003, GATTI et al., 2004).

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

Até o momento, sabe-se que a maioria das proteínas seminais pertence a três grupos: as proteínas transportadoras de dois ou quatro módulos de fibronectina tipo II (Fn-2), proteínas secretórias ricas em cisteína (CRISPs), e as espermedesinas (KARESKOSKI & KATILA, 2008).

As proteínas do grupo Fn-2 apresentam número variável de domínios de fibronectina do tipo II e estão presentes ao longo de todo o trato reprodutivo masculino, sendo expressas no corpo, cauda do epidídimo e na ampola do ducto deferente. Essas proteínas interagem especificamente com fosfatidilcolina da membrana plasmática do espermatozoide no momento da ejaculação e possuem habilidade de se ligar à heparina (EKHALASI-HUNDRIESER et al., 2005).

A heparina é estruturalmente semelhante aos glicosaminoglicanos (GAGs), as quais são secretados em grandes quantidades nos fluidos uterinos e na tuba uterina durante a fase folicular da égua, sendo responsável por mediar o processo de capacitação espermática por meio do efluxo de colesterol e fosfolípidos (MANJUNATH & THÉRIEN, 2002).

As proteínas HSP-1 e HSP-2 representam 70-80% das proteínas totais do plasma seminal equino e pertencem ao grupo das proteínas Fn-2, sendo caracterizadas pela habilidade de ligação à heparina (EKHALASI-HUNDRIESER et al., 2005).

O segundo grupo de proteínas importantes é representado pelas CRISP. Este grupo é caracterizado por apresentar 16 resíduos de cisteína em sua estrutura molecular e são divididas em CRISP1, CRISP2 e CRISP3. A CRISP 1 é expressa ao longo do epidídimo, enquanto a CRISP 2 é expressa no testículo, epidídimo e glândulas vesiculares (TÖPFER-PETERSEN et al., 2005).

Em maior quantidade, proteínas da classe CRISP 3 são expressas desde o epidídimo até o resto do trato genital, com maior expressão na ampola do ducto deferente. As CRISPs são expressas sob controle androgênico e ligam-se na região equatorial, pós-acrossomal e na peça intermediária dos espermatozoides, estando intimamente relacionadas com a fusão do espermatozoide ao oócito. A proteína HSP-3 pertence ao grupo CRISP, sendo estruturalmente semelhante às proteínas deste grupo (SCHAMBONY et al., 1998).

As espermadesinas possuem de 110 a 113 aminoácidos na sua estrutura e compreendem um único domínio CUB (domínio proteico) estabilizado por pontes dissulfídicas. Estas proteínas são multifuncionais e exibem habilidade para se ligar à heparina, a inibidores de proteinase, fosfolípidos e carboidratos (TÖPFER-PETERSEN et al., 2005).

A HSP-7 é a maior representante das espermadesinas em garanhões, e é secretada durante o trajeto do espermatozoide pelo ducto epididimário. Esta possui papel importante na interação espermatozoide-zona pelúcida (REINERT et al., 1996).

A osteopontina identificada e isolada da matriz óssea bovina, cartilagens, pele fetal, cérebro, rins, ovários, útero, bem como da urina, bile e leite bovino, e também secretadas pelo plasma seminal (SORENSEN & PETERSEN, 1993). No trato reprodutivo masculino, essa proteína é expressa nas células epiteliais das ampolas e glândulas vesiculares, em espermátides alongadas nos testículos, além do epidídimo e em espermatozoides epididimários (RODRIGUEZ et al., 2000).

É uma molécula multifuncional, tipicamente envolvida nos processos de adesão celular e remodelamento de tecidos, identificada como uma proteína de

fertilidade em touros, e considerada também como um dos marcadores de alta fertilidade existente no plasma seminal de bovinos (KILLIAN et al., 1993).

Embora as proteínas contidas no plasma seminal exerçam papel importante na funcionalidade dos espermatozoides, existe a hipótese de que o plasma não seja totalmente essencial à fertilização, ou até mesmo danifica os espermatozoides (AL-SOMAI et al., 1994). Esta hipótese é sustentada pelos estudos que demonstraram ser possível fecundar os oócitos com espermatozoides epididimais e mesmo células espermáticas primordiais (KIKUCHI et al., 1998; MARTINS et al., 2000).

2.3.1.2 Enzimas

A grande maioria das enzimas encontradas no plasma seminal funcionam como agentes antioxidantes, prevenindo a peroxidação dos lipídeos de membrana pelas espécies reativas ao oxigênio e fragmentação do DNA espermático (LEWIS et al., 1997).

A catalase, superóxido dismutase (SOD) e o sistema glutational peroxidase/redutase (GPx/GRD) são as principais enzimas com ação antioxidante encontradas no sêmen (ALMEIDA, 2006). O plasma seminal equino possui uma alta atividade da enzima catalase, e esta provém principalmente das secreções prostáticas (BALL et al., 2000).

A enzima aspartato-amino-transferase (AST) presente no plasma seminal parece estar correlacionada com a motilidade dos espermatozoides. Defeitos na membrana plasmática do espermatozoide na região da peça intermediária, onde se localiza a AST, levam à perda desta enzima, causando o bloqueio da produção de adenosina trifosfato (ATP), responsável pela cinética espermática (COLENBRANDER et al., 1992).

A enzima fosfatase alcalina (FA) é expressa em grandes quantidades nos testículos e epidídimos. A quantificação desta enzima pode ser utilizada como marcador para diferenciar azoospermia verdadeira (altos níveis de FA) de falhas na ejaculação (baixos níveis de FA) e azoospermia por bloqueio da ampola do ducto deferente (TURNER & MCDONNELL, 2003).

2.3.1.3 Hormônios

As secreções dos órgãos acessórios do trato genital masculino são essenciais para o desenvolvimento e a maturação dos espermatozoides. A presença de prostaglandinas ($\text{PGF}_{2\alpha}$ e PGE_2), estrógeno e ocitocina está associada ao transporte espermático e à eliminação de espermatozoides não viáveis, auxiliando na limpeza uterina de éguas susceptíveis à endometrite (TROEDSSON et al., 2005).

Particularmente em garanhões, grandes quantidades de estrógeno são produzidas pelos testículos, principalmente pelas células germinativas (HESS, 2003). O papel fisiológico do alto nível de estrógeno no plasma seminal de garanhões ainda não está elucidado. Entretanto, em suínos, o estrógeno em tais níveis promove o aumento da contratilidade uterina, facilitando o transporte espermático (CLAUS et al., 1989).

Estudos em roedores e suínos indicam que a prostaglandina E_2 (PGE_2) promove um efeito local na camada muscular longitudinal da tuba uterina, levando ao aumento do diâmetro luminal (RODRIGUEZ-MARTINEZ & EINARSSON, 1985). Um mecanismo regulatório similar ocorre nas éguas, em que a PGE_2 é responsável pelo transporte do embrião e parece facilitar a passagem dos espermatozoides ao longo da tuba uterina (TROEDSSON et al., 2005).

A presença de prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$ e ocitocina no plasma seminal está relacionada à contração do miométrio. As contrações uterinas agem fisicamente para a remoção de líquido acumulado e produtos nocivos resultantes do processo de inflamação após a cobertura ou inseminação artificial (TROEDSSON et al., 2005).

2.3.1.4 Íons

A função espermática é altamente dependente do ambiente iônico. A composição iônica do plasma seminal varia entre as frações do ejaculado, e também entre animais da mesma espécie. As concentrações de cálcio, fosfato inorgânico e magnésio são maiores na fração espermática, composta por secreções do epidídimo e da ampola do ducto deferente (KARESKOSKI & KATILA, 2008).

O íon cálcio é um importante regulador da fisiologia espermática, apresenta-se em grandes concentrações nos produtos secretórios da próstata, da glândula vesicular e do epidídimo. Este íon é apontado como desencadeador da reação acrossômica em espermatozoides de mamíferos, e diversas evidências demonstraram seu papel na motilidade (WONG et al., 2001).

O magnésio desempenha um papel fundamental como co-fator em mais de 300 reações enzimáticas que envolvem o metabolismo energético e a síntese de ácidos nucleicos. Sabe-se ainda que o magnésio é considerado um marcador da secreção das vesículas seminais e que age como antagonista intracelular do cálcio (WONG et al., 2001).

O zinco é originado principalmente da próstata, e desempenha um papel importante na motilidade espermática, exercendo atividade protetora antioxidante. É considerado também como fator antimicrobiano para bactérias gram-negativas e positivas (BARRIER-BATTUT et al., 2002).

O cobre é essencial para a funcionalidade de algumas enzimas. A enzima Cu-Zn superóxido dismutase (SOD), envolvida na proteção dos espermatozoides contra radicais livres, e a enzima citocromo oxidase, responsável pelo fornecimento de energia e pela imunidade celular e humoral, são dependentes do íon cobre. Estudos indicam que elevados níveis de cobre reduzem o processo oxidativo e a glicólise, o que pode levar à imobilidade e redução de viabilidade dos espermatozoides (LEONARD-MAREK, 2001).

2.4 Transporte espermático

Logo após a cobertura, ou a inseminação artificial, o útero se torna um ambiente hostil para os espermatozoides devido à ocorrência de uma reação inflamatória contra as bactérias e o sêmen. Assim, o transporte rápido é extremamente importante para que os espermatozoides alcancem a tuba uterina e possam fertilizar o oócito (TROEDSSON et al., 1998).

A duração do transporte espermático depende do intervalo entre a inseminação e a ovulação e da meia-vida funcional do espermatozoide no trato uterino da fêmea (SCOTT, 2000). As contrações musculares do trato reprodutivo, os movimentos ciliares, a corrente de fluido e a atividade flagelar dos

espermatozoides constituem os mecanismos primários do transporte espermático (HUNTER, 1981).

Scott et al., (2002) descreveram a presença de espermatozoide no lúmen da junção útero-tubárica, 18 e 26 horas após a inseminação artificial com sêmen fresco. Os autores concluíram que a junção uterotubárica também faz parte do reservatório espermático na égua.

Bader (1982) realizou um estudo em que as éguas foram eutanasiadas 2, 4 e 6 horas após a inseminação, sendo realizados lavados da junção úterotubárica, istmo e ampola da tuba uterina ipsilateral à ovulação. O número de espermatozoides na junção uterotubárica e tuba uterina foi superior 4 horas após a inseminação, quando comparado a 2 e 6 horas.

A habilidade dos espermatozoides congelados ascenderem a tuba uterina e alcançarem à ampola é muito menor que as células a fresco. Estudos indicam que embora poucos espermatozoides estejam presentes na junção uterotubárica e istmo após 2 horas da inseminação, o transporte até a ampola ainda não se completou, evento observado após 4 horas (SCALDELA et al., 2010).

Após o transporte até a tuba, os espermatozoides se aderem às células do epitélio tubárico formando o reservatório espermático. Nos equinos o reservatório se forma no istmo da tuba uterina até quatro horas após a monta ou inseminação artificial (BADER, 1982).

2.5 Espermatozoides provenientes do epidídimo x ejaculado

Em gatos, a gota citoplasmática distal foi o defeito mais frequente em espermatozoides provenientes da cauda do epidídimo e provavelmente está relacionado ao processo de maturação espermática durante sua passagem pelo epidídimo. Sendo que o espermatozoide irá perder este resquício citoplasmático durante a ejaculação (AXNER et al., 1998).

Foi verificado por Yu & Leibo (2002), na espécie canina, que após 6 horas da orquiectomia, a integridade da membrana do espermatozoide a fresco foi de 70 a 80%. Após 48 horas, mais de 70% das células recuperadas do epidídimo refrigerado apresentavam membrana intacta, valores semelhantes ao do ejaculado. Em contraste, foi observado que a motilidade espermática diminuiu

significativamente nas primeiras 5 horas de refrigeração, após esse período o decréscimo foi mais lento.

De acordo com Johnston et al., (2001), a concentração de espermatozoides recuperados do epidídimo de cães é semelhante a concentração espermática descrita para o ejaculado.

De acordo com Yang et al., (1993) e Yanagimachi (1994) os espermatozoides armazenados no epidídimo bovino possuem a capacidade de fecundar o oócito, entretanto, o plasma seminal possui fatores decapacitantes, o que promovem alterações metabólicas e bioquímicas em sua estrutura, contribuindo com a capacitação e reação do acrossomo. Apesar disto, Amann et al., (1974), também trabalhando com bovinos, mostraram que espermatozoides da cauda do epidídimo possuem capacidade de fertilização similar ao do ejaculado.

Santos & Vannucchi (2002), relacionaram a baixa motilidade e vigor espermático da célula epididimária descongelada à imaturidade da célula espermática bovina. Entretanto, apesar de Martins et al., (2003) também terem detectado uma queda significativa da motilidade espermática após a descongelação do sêmen bovino, a porcentagem de células íntegras e a porcentagem de células morfológicamente normais foram semelhantes aos resultados obtidos na descongelação de espermatozoides obtidos de ejaculados e do epidídimo.

Estudos realizados por Silva et al., (2003) mostraram que a motilidade (50 a 90%) e vigor espermático do ejaculado foi maior do que a dos espermatozoides do epidídimo (20 a 70%), respectivamente. Diferença essa que poderia ser atribuída a imaturidade da célula espermática proveniente da cauda do epidídimo. Não foram observadas diferenças significativas quanto aos defeitos morfológicos, integridade do acrossomo e da cromatina entre os dois grupos.

Em muare, Glória et al., (2011) observaram diferenças significativas na viabilidade ($90,9 \pm 3,7\%$ em espermatozoides do epidídimo e $71,7 \pm 6,1\%$ no ejaculado) e atividade mitocondrial ($85,7 \pm 3,1\%$ e $77,6 \pm 2,6\%$ em espermatozoides do epidídimo e ejaculado, respectivamente), embora valores de motilidade total e progressiva tenham sido semelhantes, tanto para espermatozoides epididimários quanto para o ejaculado.

Em equinos, Monteiro et al. (2011) observaram que o número médio de espermatozoides obtidos do ejaculado (colhidos com vagina artificial) e da cauda do epidídimo foi, respectivamente: 6,9 e $20,4 \times 10^9$. Estes resultados são semelhantes a achados anteriores, nos quais o número total de espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo foi superior aos colhidos com vagina artificial (MONTEIRO, 2010; GRANEMANN, 2006; MURADÁS et al., 2006).

De acordo com Monteiro et al., (2011) os parâmetros motilidade e velocidade dos espermatozoides do epidídimo foram superiores aos espermatozoides do ejaculado.

Aurich (1996) demonstrou efeito deletério na viabilidade espermática com a adição do plasma seminal proveniente de ganhões de baixa congelabilidade. Além disso, outros estudos demonstraram que proteínas contidas no plasma seminal podem promover alterações bioquímicas, levando a danos na membrana plasmática com prejuízos na fertilidade e congelabilidade espermática (MOORE & HIBBIT, 1976; MOUSTAFA & MEZAROS, 1981).

Monteiro et al., (2011) observaram maior porcentagem de defeitos morfológicos de cauda e defeitos totais nos espermatozoides do ejaculado quando comparado com espermatozoides da cauda do epidídimo de ganhões. Estes achados diferem de resultados obtidos por Monteiro (2010) em que não houve diferença na morfologia espermática entre espermatozoides do epidídimo e do ejaculado, além de estudos realizados em bovinos por Silva et al. (2003) e Martins et al. (2007), que detectaram maior frequência de gota protoplasmática em amostras do epidídimo quando confrontadas com o sêmen do ejaculado.

2.6 Reservatório espermático na tuba uterina

A tuba uterina consiste de três segmentos, cada um com diferentes funções: istmo, ampola e infundíbulo. O istmo possui a função de armazenamento espermático, a ampola proporciona um ambiente favorável a fertilização e ao desenvolvimento embrionário inicial e o infundíbulo possui fimbrias para captação do oócito. A tuba uterina comunica-se com o útero pela junção uterotubárica que proporciona uma barreira aos microorganismos patogênicos que possam invadir a tuba uterina a partir do útero, além de regular a passagem do espermatozoide (SUAREZ, 2008).

As células espermáticas ficam retidas no reservatório espermático da tuba uterina pela combinação de inúmeros fatores. Dentre estes uma constrição localizada no istmo em vista do edema da mucosa da tuba uterina associado à fase do ciclo estral, fazendo com que haja a queda da motilidade espermática neste local. Assim como aprisionamento dos espermatozoides no muco local e fixação às células epiteliais da tuba uterina (THOMAS et al., 1994).

A incubação *in vitro* com células do reservatório espermático aumenta a viabilidade do espermatozoide equino (TROEDSSON et al., 1998). *In vivo*, pesquisas demonstraram que o reservatório espermático possui diferentes funções como prevenção da capacitação espermática precoce, por manter em nível basal a concentração intracelular de cálcio. Assim como a redução do risco de poliespermia por liberar uma quantidade pequena e suficiente de espermatozoides para a fecundação no momento da ovulação (LEFEBVRE et al., 1995).

Análise por micrografia eletrônica demonstrou que os espermatozoides se ligam às células ciliadas e não ciliadas, sendo que as células epiteliais do istmo apresentaram maior número de espermatozoides fixados quando comparadas às da ampola. Maior número de espermatozoides se liga ao epitélio da tuba uterina nas fases folicular e pós-ovulação quando comparado com diestro (THOMAS et al., 1994).

Pesquisas relatam diferenças entre garanthões no que se refere a formação do reservatório espermático, sendo que espermatozoides proveniente de garanthões sub-férteis possuem uma menor capacidade de adesão às células epiteliais da tuba uterina quando comparado com espermatozoides provenientes de garanthões férteis (SCOTT et al., 1995).

De acordo com Katila et al. (1996) protocolos de criopreservação do sêmen equino causam danos subletais ao espermatozoide o qual prejudica a formação do reservatório espermático. Assim sendo, a criopreservação leva a uma diminuição no número de espermatozoides aderido as células da tuba uterina após a inseminação, como também uma diminuição do tempo de sobrevivência destes gametas, necessitando de precisão no que se refere ao momento da inseminação.

Nos bovinos, a ligação dos espermatozoides do epidídimo ao epitélio da tuba uterina ocorre em um nível baixo, porém quando acrescido das proteínas BSPs

(A1 e A2) purificadas, a partir do plasma seminal, a ligação aumenta para níveis comparados com o do ejaculado (GWATHMEY et al., 2003).

Receptores para as proteínas BSPs na tuba uterina bovina foram isolados a partir de extratos do epitélio da membrana apical utilizando proteínas purificadas BSPs como armadilhas. Os receptores foram identificados como sendo quatro membros da família das proteínas anexinas (ANXA1, -2, -4, -5) sendo fortes candidatos para os receptores de espermatozoides no epitélio da tuba uterina bovina (IGNOTZ et al., 2007).

ANXAs compreendem uma grande família de proteínas cujas funções são mal compreendidas. Tais proteínas foram localizadas no interior das células epiteliais da tuba uterina, em secreções e na superfície destas. Cada receptor ANXA isoladamente é suficiente para elevar a ligação do espermatozoide com o epitélio da tuba uterina a valores semelhantes ao do ejaculado, sendo improvável que elas sejam necessárias em conjunto como um complexo (RESCHER & GERKE, 2007).

ANXA1 é secretada pela próstata humana em quantidades elevadas no plasma seminal. Contudo, se desconhece se o espermatozoide humano transporta as ANXAs do plasma seminal até a tuba uterina, onde estas podem ser substituídas por ANXAs do epitélio. Considerando que BSPs, individualmente, melhoram a ligação do espermatozoide ao epitélio da tuba uterina, não se conhece se cada ANXA pode atuar como um receptor independente para o espermatozoide (CHRISTMAS et al., 1991).

As proteínas BSP diferem umas das outras na distribuição de carga eletrostática da superfície. Esta propriedade confere as BSPs diferentes afinidades de ligação de uma molécula na superfície do espermatozoide com a molécula oposta no epitélio tubárico. Do mesmo modo, as várias ANXAs presentes na tuba uterina devem ter diferentes afinidades de ligação e cinética com as BSPs espermáticas (GWATHMEY et al., 2006).

Assim, a interação entre as BSPs espermáticas e as ANXAs da tuba uterina pode fornecer um sistema regulatório para assegurar que células espermáticas sejam mantidas férteis no reservatório e sejam gradualmente liberadas no momento apropriado para assegurar a fertilização (FAN et al., 2006).

A ligação do espermatozoide ao epitélio de alguma forma preserva sua fertilidade durante o armazenamento. O espermatozoide aderido ao epitélio da

tuba uterina mantém baixos níveis de Ca^{2+} citoplasmático, em comparação aos espermatozoides com movimentação livre (DOBRINSKI et al., 1997; DOBRINSKI et al., 1996).

O mecanismo para a prevenção do aumento de Ca^{2+} citoplasmático em espermatozoides não é totalmente elucidado, mas sugere-se que a catalase, presente na tuba uterina bovina, serve para minimizar os danos peroxidativos às membranas dos espermatozoides, impedindo o influxo de Ca^{2+} para a célula (LAPOINTE et al., 1998).

Em um sistema de co-cultivo heterólogo entre espermatozoides de garanhões e células do epitélio tubárico bovino, foi observada a adesão das células espermática às células da tuba uterina, ocorrendo o aumento da sobrevivência dos espermatozoides, *in vitro*. Resultado semelhante ao que foi observado em sistema de co-cultivo espermatozoide-*explants* da mesma espécie (ELLINGTON et al., 1998; SAMPER et al., 1995).

Embora as lecitinas que intermediam a ligação entre o espermatozoide e as células do epitélio tubárico sejam diferentes entre bovinos e equinos, foi constatada uma adesão celular com subsequente prolongamento na viabilidade espermática em sistema de co-cultivo, o que comprova a viabilidade da utilização da técnica entre espécies diferentes (SAMPER et al., 1995).

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar do seu incompleto desenvolvimento funcional, as células germinativas da cauda do epidídimo são capazes de desempenhar sua função de forma efetiva.

Com a melhoria dos extensores e dos métodos de colheita de células espermáticas da cauda do epidídimo, se tornou possível a utilização deste tipo celular na fertilização de oócitos de várias espécies animais, o que é de suma importância, pois aumenta a possibilidade de preservação do germoplasmas.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J.L. **Efeito de diferentes concentrações de plasma seminal na criopreservação do sêmen equino**. 2006. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília; Brasília, 2006.

AL-SOMAI, N.; VISHWANATH, R.; MOLAN, P.C. Anionic and cationic components from protein aggregates in bovine seminal plasma and their effects on sperm motility. **Molecular Reproduction and Development**. v.39, p.328-336, 1994.

AMANN, R.P.; GRIEL Jr., L.C. Fertility of bovine spermatozoa from rete testis, cauda epididymidis and ejaculated sperm. **Journal of Dairy Science**. v.57, p.212-9, 1974.

AMANN, R. P. Physiology and endocrinology. In: McKinnon, A. O.; Voss, J. L. (Eds.). **Equine Reproduction**. Lea & Febiger. cap. 76, p. 645-657, 1993.

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.

AXNÉR, E.; STRÖM HOLST, B.; LINDE-FORSBERG, C. Morphology of spermatozoa in the cauda epididymis before and after electroejaculation and a comparison with ejaculated spermatozoa in the domestic cat. **Theriogenology**. v.50, p.973-979, 1998.

BADER, H. A. An investigation of sperm migration into the oviducts of the mare. **Journal Reproduction Fertility**, v.32, p.59-64, 1982.

BARKER, L.O.S.; AMANN, R.P. Epididimal physiology. II. Immunofluorescent analyses of epithelial secretion and absorption of bovine sperm maturation. **Journal Reproduction Fertility**, v.26, p.319-332, 1971.

BARRIER-BATTUT, I.; DELAJARRAD, H.; LEGRAND, E.; BRUYAS, J.F.; FIÉNI, F.; TAINTURIER, D. Calcium, magnesium, copper and zinc in seminal plasma of fertile stallions, and their relationship with semen freezability. **Theriogenology**, v.58, p.229-32, 2002.

BALL, B.A.; GRAVANCE C.G.; Medina, V.; Baumber, J.; Liu I.K. Catalase activity in equine semen. **American Journal Veterinary Research**, v.61, p.1026-69, 2000.

BEDFORD, J.M. Development of the fertilizing ability of spermatozoa in the epididymis of the rabbit. **Journal of Experimental Zoology**, v.163, p.319-330, 1966.

BEDFORD, J.M. Maturation, transport and fate of spermatozoa in the epididymis. In: HAMILTON, D. W.; GREEP, R. O. **Handbook of physiology**. Washington D.C.: American Physiology Societ. v.5, p.303-317, 1975.

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

BRANDT, H.; ACOTT, T.S.; JOHNSON, D.B. Evidence for an epididymal origin of bovine sperm forward motility protein. **Biology of Reproduction**, v.19, p.830-835, 1978.

BRUEMMER, J.E. Collection and freezing of epididymal stallion sperm. **Veterinary Clinics of North American: Equine Practice**, v.22, p.677-82, 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. **Canadian Veterinary Journal**, v.45, p.35-41, 2004.

CHRISTMAS, P.; CALLAWAY, J.; FALLON, J.; JONES, J.; HAIGLER, H.T. Selective secretion of annexin 1, a protein without a signal sequence, by the human prostate gland. **Journal Biology Chemistry**, v.266, p.2499-507, 1991.

CLAUS, R.; ELLENDORF, F.; HOANG-VU, C. Spontaneous electromyographic activity throughout the cycle in the sow and its change by intrauterine oestrogen infusion during oestrus. **Journal Reproduction Fertility**, v.87, p.543-51, 1989.

COLENBRANDER, B.; FAZELLI, A.R.; VAN BUITEN, A.; PARLEVLIT, J.; GADELLA, B.M. Assessment of sperm cell membrane integrity in the horse. **Acta Veterinaria Scandinavica**. v.88, p.49-58, 1992.

COSTA, D.S.; PAULA, T.A.R. Espermatogênese em mamíferos. **Scientia**, Vila Velha, v.4, n.1-2, p.53-72, 2003.

DACHEUX, J.L.; GATTI, J.L.; DACHEUX, F. Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. **Microscopy Research and Technique**, v.61, p.7-17, 2003.

DOBRINSKI I.; SUÁREZ, S.S.; BALL, B.A. Intracellular calcium concentration in equine spermatozoa attached to oviductal epithelial cells *in vitro*. **Biology Reproduction**, v.54, p.783-788, 1996.

DOBRINSKI, I.; SMITH, T.T.; SUÁREZ, S.S.; BALL, B.A. Membrane contact with oviductal epithelium modulates the intracellular calcium concentration of equine spermatozoa in vitro. **Biology Reproduction**, v.56, p.861-869, 1997.

EKHALASI-HUNDRIESER, M.; SCHAFER, B.; KIRCHHOF, C.; HESS, O.; BELLAIR, S.; MÜLLER P. Structural and molecular characterization of equine sperm-binding fibronectin-II module proteins. **Molecular Reproduction Development**, v.70, p.45-57, 2005.

ELLINGTON, J.E.; JONES, A.E.; DAVITT, C.M.; SCHNEIDER, C.S.; BRISBOIS, R.S.; HISS, G.A.; WRIGHT JR, R.W. Human sperm function in co-culture with

human, macaque or bovine oviduct epithelial cell monolayers. **Human Reproduction**, v.13, p.2797-2804, 1998.

FAN, J.; LEFEBVRE, J.; MANJUNATH, P. Bovine seminal plasma proteins and their relatives: a new expanding superfamily in mammals. **Gene**, v.375, p.63–74, 2006.

GATTI, J.L.; CASTELLA, S.; DACHEUX, F.; ECROYD, H.; METAYER, S.; THIMON V. Post- testicular sperm environment and fertility. **Animal Reproduction Science**, 82-83:321-39. 2004.

GLORIA, A; CONTRI, A; AMICIS, I.D; ROBBE, D; CARLUCCIO, A. Differences between epididymal and ejaculated sperm characteristics in donkey. **Animal Reproduction Science**, v.128, p.117–122, 2011.

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

GUASTI, P.N; MONTEIRO, G.A; DELLAQUA JUNIOR, J.A; MELO, C.M; MAZIEIRO, R.R.D; MARTIN, J.C. Viability of equine frozen epididymal sperm treated with Pentoxifylline. In: **Proceedings of the 11th Congress of World Equine Veterinary Association**. Guaruja, 2009, WEVA, p.323.

GWATHMEY, T.M.; IGNOTZ, G.G.; SUAREZ, S.S. PDC-109 (BSP-A1/ A2) promotes bull sperm binding to oviductal epithelium in vitro and may be involved in forming the oviductal sperm reservoir. **Biology Reproduction**, v.69, p.809-815, 2003.

GWATHMEY, T.M.; IGNOTZ, G.G.; MUELLER, J.L.; MANJUNATH, P.; SUAREZ, S.S. Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDa share functional roles in storing sperm in the oviduct. **Biology Reproduction**, v.75, p.501–507, 2006.

HAFEZ, E.S.E. & HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. São Paulo, 7ª ed. Manole, 2004, p.173-180.

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.

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

HESS, R.A. Estrogen in the adult male reproductive tract: a review. **Reproduction Biology Endocrinology**, v.1, p.1-52, 2003.

HUNTER, R.H.F. Sperm transport and reservoirs in the pig oviduct in relation to the time of ovulation. **Journal Reproduction Fertility**, v.63, p.109-117, 1981.

IGNOTZ, G.G.; CHO, M.Y.; SUAREZ, S.S. Annexins are candidate oviductal receptors for bovine sperm surface proteins and thus may serve to hold bovine sperm in the oviductal reservoir. **Biology Reproduction**, v.77, p.906–13, 2007.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). **Produção da pecuária nacional 2011**. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=2241&id_pagina=1. Acesso em: 18 dezembro de 2013.

JOHNSON, L.; BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D.; SCRUTCHFIELD, W.L. Factors affecting spermatogenesis in the stallion. **Theriogenology**, v.48, p.1199-1216, 1997.

JOHNSTON, S.D.; KUSTRITZ, M.V.R.; OSLOM, P.N.S. Semen collection, evaluation and preservation: Canine and feline. **Theriogenology**, p.287-306, 2001.

KARESKOSKI, M.; KATILA, T. Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. **Animal Reproduction Science**, v.107, p.249-56, 2008.

KATILA, T.; CELEBI, M.; KOSKINEN, E. Effect of timing of frozen semen insemination on pregnancy rate in mares. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.37, p. 361–365, 1996.

KERR, J.B.; LOVELAND, K.L.; O'BRYAN, M.K.; KRETZER, D.M. Cytology of the Testis and Intrinsic Control Mechanisms. In: Neill, J. D. (ed.) **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**, 3^a Edit. p.827-947, 2006.

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

KILLIAN, G.J.; CHAPMAN, D.A.; ROGOWSKI, L.A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. **Biology of Reproduction**, v.49, p.1202-207, 1993.

LAPOINTE, S.; SULLIVAN, R.; SIRARD, M. A. Binding of a bovine oviductal fluid catalase to mammalian sperm. **Biology of Reproduction**, v. 58, p.747–753, 1998.

LEFEBVRE, R. Characterization of the oviductal sperm reservoir in cattle. **Biology of Reproduction**, v.53, p.1066-1074, 1995.

LEONARD-MAREK, S. Influence of drugs, pollution and trace elements on male fertility. In: Busch, W.; Holzmann A. **Andrology in veterinary medicine**. Schattauer: Stuttgart. p.474-81, 2001.

LEWIS, S.E.M.; STERLING, E.S.L.; YOUNG, I.S. Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. **Fertility Sterility**, v.67, p.142-7, 1997.

MANJUNATH, P.; THÉRIEN, I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. **Journal Reproduction Immunology**. v.53, p.109-19, 2002.

MARENCO, 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.

MARTINS, C.F.; SILVA, A.E.D.F.; MATARAZZO, R. Evaluation of the quality of cryopreserved bovine epididymal spermatozoa by analysis of motility, acrossomal status, penetration ability in oocytes and integrity of sperm chromatin. **Biology of Reproduction**, v.62, Supl.1, p.156, 2000.

MARTINS, M.I.M.; SOUZA, F.F.; CHIRINÉA, V.H.; TEBET, J.; LOPES, M.D. **Viabilidade de espermatozoides criopreservados, obtidos do epidídimo de cães**. In: Mostra Científica da FMVZ/UNESP, 2003, Botucatu-SP. Anais ... Botucatu: FMVZ/UNESP, p.121, 2003.

MARTINS, C.F.; RUMPF, R.; PEREIRA, D.C.; DODE, M.N. Cryopreservation of epididymal bovine spermatozoa from dead animals and its uses in vitro embryo production. **Animal Reproduction Science**, v.101, p.326-31, 2007.

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

MONTEIRO, G.A; GUASTI, P.N; MELO, C.M; DELLAQUA JUNIOR, J.A; MARTIN, J.C; CARNEIRO, R. **Comparison between cooled sperm from ejaculate and epididymal cauda**. In: Proceedings of the 11th Congress of World Equine Veterinary Association; 2009, Guarujá: WEVA; p.296, 2009.

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

MONTEIRO, G.A; PAPA, F.O; GUAUST, 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 subférteis. **Veterinári e Zootecnia**, v.18, p.255-263, 2011.

MOORE, H.D.M.; HIBBIT, K.C.S. The binding of labeled basic proteins by boar spermatozoa. **Journal Reproduction Fertility**, v.46, p.71-7, 1976.

MOORE, I.; SQUIRES, E.L.; GRAHAM, J.K. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.63, p.2372-81, 2005.

MORRIS, L.; TIPLADY, C.; ALLEN, W.R. The in vivo fertility of cauda epididymal spermatozoa in the horse. **Theriogenology**, v.58, p.643-6, 2002.

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, p.403-8, 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 equínos colhidos por vagina artificial e por lavagem da cauda do epidídimo. **Archives of Veterinary Science**, v.11, p.69-74, 2006.

NEVES, E.S. **Estudo comparativo da estrutura do testículo e do processo espermatogênico em jumentos (Equus asinus) e burros(Equus mulus mulus)**. 2001. 135p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – MG, 2001.

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

REINERT, M.; CALVETE, J.J.; SANZ, L.; MANN, K.; TÖPFER-PETERSEN, E. Primary structure of stallion seminal plasma protein HSP-7, a zona-pellucida-binding protein of the spermadhesin family. **European Journal Biochemical**, .242, p.636-40, 1996.

RESCHER, U.; GERKE, V. family, friends and functions. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v.S100A10, p.11, 2007.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; EINARSSON, S. Influence of prostaglandins on the spontaneous motility of pig oviducts. **Animal Reproduction Science**, v.8, p.259-79, 1985.

RODRÍGUEZ, C.M.; DAY, J.R.; KILLIAN, G.J. Expression of the lipocalin-type prostaglandin D synthase gene in the reproductive tracts of Holstein bulls. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.120, p.303-309, 2000.

SAMPER, J.; ELLINGTON, J.; BURNETT, K.; JONES, A.; WRIGHT, R. Use of sperm and oviduct cell co-culture as a test for stallion field fertility. **American Association of Equine Practitioners Proceedings**, v.41, p.3-5, 1995.

SANTOS, S.E.C.; VANNUCCHI, C.I. Criopreservação de espermatozoides epididimários em cães pós-morrem. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, p.129-276, 2002.

SCALDELAI, P. R. R.; BERTOZZO, B. R.; SHIROMA, M. Y. M.; CASTRO, J. B.; ZÚCCARI, C. E. S. N. Aspectos relacionados ao uso do sêmen congelado de garanhões. Canoas, **Veterinária em Foco**. v.7 n.2 p.108-123, 2010.

SCOTT, M.A.; LIU, I.K.; OVERSTREET, J.W. Sperm transport to the oviducts: abnormalities and their clinical implications. **American Association of Equine Practitioners Proceedings**, v.41, p.1–2, 1995.

SCOTT M.A. A glimpse at sperm function in vivo: sperm transport and epithelial interaction in the female reproductive tract. **Animal Reproduction Science**, n.60-61, p.337-348, 2000.

SCOTT, M. A.; VARNER, D. D.; LIU, I. K. M.; ENDERS, A. C. Presumptive evidence of a preovulatory sperm reservoir in the mare: morphological investigations using scanning electron microscopy. **Theriogenology**, v.58, p.639-642, 2002.

SCHAMBONY, A.; HESS, O.; GENTZEL, M.; TÖPFER-PETERSEN, E. Expression of CRISP proteins in the male equine genital tract. **Journal Reproduction Fertility**, v.53, p.67-72, 1998.

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

SILVA, A.E.D.F.; DIAS, A.L.; UNANIAN, M.M.; FREITAS, A.R.; JUNIOR, C.B. Conteúdo de Peptídeos e Avaliação Morfofisiológica dos Espermatozoides do Epidídimo e Ejaculado de Bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.6, p.1890-1900, 2003.

SORENSEN, E. S.; PETERSEN, T. E. Purification and characterization of three proteins isolated from the proteose peptone fraction of bovine milk. **Journal of Dairy Research**, v.60, p.198-197, 1993.

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

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 and Diseases Journal**, v.35, p.1-10, 2005.

VARNER, D.D.; JOHNSON, L. From a Sperm's Eye View—revisiting our perception of this intriguing cell. **Proceedings of the American Association of Equine Practitioners**, v.53, p.104-177, 2007.

TIPLADY, C.A.; MORRIS, L.H.A.; ALLEN, W.R. Stallion epididymal spermatozoa: pre-freeze and post-thaw motility and viability after three treatments. **Theriogenology**, v.58, p.225-8, 2002.

THOMAS, P. G. A.; BALL, B. A.; BRINSKO, S. P. Interaction of equine spermatozoa with oviduct epithelial cell *explants* is affected by estrous cycle and anatomic origin of explant. **Biology Reproduction**, v.51, p.222-228, 1994.

TÖPFER-PETERSEN, E.; EKHLASI-HUNDRIESER, M.; KIRCHHOFF, C.; LEEB, T.; SIEME, H. The role of stallion seminal proteins in fertilization. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.159-70, 2005.

TROEDSSON, M. H. T.; LIU, I. K. M.; CRABO, B. G. Sperm transport and survival in the mare. **Theriogenology**, v.49, p.905-915, 1998.

TROEDSSON, M.H.T.; DESVOUSGES, A.S.; ALGHAMDI, A.S.; DAHMS, B.; DOW, C.A.; HAYNA, J. Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.171-86, 2005.

TURNER, R.M.O.; MCDONNELL, S.M. Alkaline phosphatase in stallion semen: characterization and clinical applications. **Theriogenology**, v.60, p.1-10, 2003.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: KNOBIL, E.; NEIL, J.D. (Eds) **The physiology of the reproduction**. 2.ed. New York: Raven Press, p.189-317, 1994.

YANG, X.; JIANG, S.; FOOTE, R.H. Bovine oocyte development following different oocyte maturation and sperm capacitation procedures. **Molecular Reproduction and Development**, v.34, p.94-100, 1993.

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

WITE, R.G. Secreções do trato reprodutivo masculino e plasma seminal. In: Hafez ESE. **Reprodução Animal**. 4a ed. São Paulo: Manole; p.212-28, 1988.

WONG, W.Y.; FLIK, G.; GROENEN, P.M.W.; SWINKLES, D.W.; THOMAS, C.M.G.; COPIUS-PEEREBOOM, J.H.J. The impact of calcium, magnesium, zinc, and copper in blood and seminal plasma on semen parameters in men. **Reproductive Toxicology**, v.15, p.131-6, 2001.

CAPÍTULO II
TRABALHO CIENTÍFICO

27 fresco e pós congelação, bem como a taxa de aderência às células da tuba uterina.
28 De acordo com os resultados, os espermatozoides provenientes do ejaculado
29 apresentaram MT ($78,6 \pm 2,6$ e $45,6 \pm 5,1$, fresco e congelado respectivamente)
30 semelhante aos observados nos espermatozoides provenientes da cauda do
31 epidídimo ($64,7 \pm 5,5$ e $19,1 \pm 5,4$, fresco e congelado respectivamente) ($p > 0,05$).
32 Entretanto, para todas as outras características espermáticas, os valores do sêmen
33 do ejaculado foram superiores aos observados nas amostras provenientes do
34 epidídimo, tanto para as amostras a fresco como pós congelação ($p < 0,05$). A taxa de
35 adesão dos espermatozoides epididimários às células da tuba uterina aumentou
36 progressivamente do corpo ($6,7 \pm 1,9$ e $9,8 \pm 1,2$, sêmen fresco e congelado
37 respectivamente) para a cauda ($17,8 \pm 9,4$ e $17,7 \pm 2,3$, sêmen fresco e congelado
38 respectivamente), porém foram inferiores estatisticamente em relação aos
39 espermatozoides do ejaculado ($88,2 \pm 13,5$ e $72,8 \pm 6,8$, sêmen fresco e congelado
40 respectivamente) ($p < 0,05$). Entretanto, não houve diferença significativa entre a taxa
41 de adesão em relação ao sêmen fresco e congelado ($p > 0,05$). Baseado nos
42 resultados, a taxa de ligação dos espermatozoides aos *explants* de tuba uterina foi
43 menor nos espermatozoides provenientes do epidídimo em relação ao sêmen
44 ejaculado e o processo de congelação espermática não afeta essas ligações.

45

46 Palavras-chave: ístimo, égua, congelação, garanhão.

47

48 **1. INTRODUÇÃO**

49 Estudos recentes em equinos demonstram um avanço significativo quanto à
50 viabilidade e fertilidade dos espermatozoides recuperados a partir da cauda do
51 epidídimo, entretanto, sua capacidade de adesão às células epiteliais da tuba uterina

52 na formação do reservatório espermático ainda necessitam de maiores
53 investigações.

54 Essa adesão é importante, pois os reservatórios espermáticos possuem
55 diferentes funções como a redução do risco de poliespermia por liberar uma
56 quantidade gradativa de espermatozoides para a fecundação no momento da
57 ovulação, prevenção da capacitação espermática precoce por manter em nível basal
58 a concentração intracelular de cálcio [1] e aumento da viabilidade do
59 espermatozoide equino [2]. Estudos anteriores realizados *in vitro*, demonstraram que
60 existe uma correlação positiva entre adesão dos espermatozoides às células da tuba
61 uterina e taxa de fertilidade, na espécie bovina [3].

62 O contato dos espermatozoides epididimários com o plasma seminal é
63 necessário para incorporação de proteínas essenciais para que estes adquiram a
64 capacidade de se aderir aos sítios de ligação dos reservatórios espermáticos na
65 tuba uterina [4].

66 Na inseminação artificial com espermatozoides da cauda do epidídimo, os
67 gametas não entram em contato com o plasma seminal, podendo assim não adquirir
68 essa capacidade de fixação no sítio de ligação. Nesse sentido, a verificação da
69 capacidade dos espermatozoides provenientes diretamente do epidídimo de se
70 ligarem ou não às células epiteliais da tuba uterina pode contribuir para um melhor
71 entendimento e aplicabilidade dessa nova biotecnologia.

72 Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar a capacidade de ligação
73 de espermatozoides epididimários e provenientes do ejaculado às células da
74 tuba uterina heteróloga cultivadas *in vitro*.

75

76

77 **2.MATERIAL E MÉTODOS**

78

79 **2.1 Produtos e reagentes**

80 Todos os produtos e reagentes utilizados para cultivo das células da tuba
81 uterina foram adquiridos da Life™, Carlsbad, CA, Estados Unidos.

82

83 **2.2 Animais**

84 Foram utilizados 10 (dez) garanhões, sendo 6 animais da raça Andaluz e 4
85 animais da raça Brasileiro de Hipismo (BH), com idade entre 34 e 38 meses,
86 provenientes do Haras Itapuã, localizado na cidade de Arandú, São Paulo - Brasil
87 (Latitude: 23° 8' 9" Sul, Longitude: 49° 3' 17" Oeste). Os animais encontravam-se
88 clinicamente sadios e previamente ao estudo foram submetidos a exame
89 andrológico.

90

91 **2.3 Obtenção dos Espermatozoides**

92

93 **2.3.1 Ejaculado**

94 Uma semana após o exame andrológico, o ejaculado dos garanhões foi colhido
95 e utilizado para as avaliações. Uma fração espermática *in natura* foi diluída em
96 diluidor a base de leite desnatado (Botu-Semen®, Botufarma, Botucatu, São Paulo -
97 Brasil) para concentração de 50×10^6 espermatozoides/mL e transportada, por
98 aproximadamente 60 minutos, para o laboratório da UNESP-Botucatu.

99

100

101

102 **2.3.2 Epidídimo**

103 Uma semana após a colheita do ejaculado foi realizada a orquiectomia bilateral
104 destes mesmos animais. O procedimento cirúrgico foi realizado com os ganhões
105 em estação, utilizando 0,5 mg/kg/i.v de cloridrato de xilazina 10% (Sedomin[®], König,
106 Santana de Parnaíba, São Paulo - Brasil), associado a 0,05 mg/Kg/i.v de cloridrato
107 de acepromazina (Acepran[®], Vetnil, Louveira, São Paulo - Brasil) para a sedação.
108 Após 15 minutos da administração dos sedativos, foi realizada a antissepsia da
109 região escrotal com polivinilpirrolidona-iodo (Riodeine[®], Rioquímica, São José do
110 Rio Preto, São Paulo – Brasil). Em seguida foram realizadas duas incisões de
111 aproximadamente 8cm paralelas à rafe mediana escrotal. Os testículos foram
112 expostos pela incisão da túnica dartos e da túnica vaginal parietal, tracionados e em
113 seguida foi efetuada uma incisão e hemostasia do funículo com o auxílio de um
114 emasculador. Os testículos foram identificados, acondicionados em uma solução de
115 Ringer com lactato de sódio (HalexIstar, Goiânia, Goiás – Brasil) e transportados a
116 15°C em recipiente adequado até o laboratório para processamento.

117

118 **2.4 Processamento das amostras**

119

120 **2.4.1 Ejaculado**

121 Ao chegarem ao laboratório as amostras foram avaliadas em relação a cinética
122 espermática pelo sistema computadorizado (CASA, HTM–IVOS 12, Hamilton Thorne
123 Research, Beverly, MA, USA) e integridade da membrana plasmática por
124 microscopia de epifluorescência. Uma alíquota foi destinada ao teste de ligação às
125 células da tuba uterina e o restante da amostra submetida ao processo de
126 congelação, conforme tópico 2.4.

127 **2.4.2 Epidídimo**

128 Após a chegada dos testículos ao laboratório, os epidídimos foram divididos em
129 relação a suas três regiões anatômicas (cabeça, corpo e cauda) para obtenção das
130 diferentes populações espermáticas, utilizando a técnica de flutuação relatada por
131 Cary et al. [5]. Os espermatozoides foram recuperados em diluidor a base de leite
132 desnatado (Botu-Semen[®]) e a concentração foi ajustada para 50×10^6
133 espermatozoides/mL. Então, uma alíquota de cada segmento do epidídimo foi
134 destinada ao teste de ligação às células epiteliais da tuba uterina e o restante
135 submetido a congelação. Para os espermatozoides recuperados do epidídimo, a
136 análise da cinética espermática foi realizada após a ressuspensão no diluidor de
137 congelação (Botu-Crio[®], Botufarma, São Paulo - Brasil), devido à somente nesse
138 momento os espermatozoides evidenciarem sua movimentação total [6].

139

140 **2.5 Congelação e descongelação das amostras seminais**

141 As amostras do ejaculado e as do epidídimo destinadas a congelação foram
142 inicialmente centrifugadas a 600xg por 10 minutos e, posteriormente o sobrenadante
143 foi desprezado sendo o “pellet” resultante ressuspendido com o diluente de
144 congelação (Botu-Crio[®], Botufarma, Botucatu, São Paulo - Brasil) na concentração
145 de 100 milhões de espermatozoides/mL e envasadas em palhetas de 0,5mL. As
146 palhetas foram submetidas a estabilização em geladeira digital com temperatura
147 controlada (Minitub, Porto Alegre, Rio Grande do Sul – Brasil) a 5°C por 20 minutos.
148 Posteriormente, foram acondicionadas em caixa isotérmica a 6 cm do nível
149 nitrogênio líquido por 20 minutos, e finalmente imersas e armazenadas em botijão
150 criobiológico [7].

151 A descongelação foi efetuada em banho-maria utilizando a temperatura de
152 46°C por 20 segundos [8].

153

154 **2.6 Avaliações espermáticas**

155

156 **2.6.1 Cinética espermática**

157 Para cada amostra foram selecionados 5 campos aleatórios para avaliação da
158 cinética espermática através da análise computadorizada (CASA, HTM-IVOS 12,
159 Hamilton Thorne Research, Beverly, MA, USA). Foram analisados os parâmetros de
160 motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %) e porcentagem de
161 espermatozoides com movimento rápido (RAP, %). O setup do CASA utilizado neste
162 experimento encontra-se descrito na Quadro 1.

163

164

165

166

167

168

169

170

171

172

173

174 **Quadro 1** – Metodologia da análise computadorizada (CASA) da cinética
175 espermática de equinos.

Parâmetro	Ajustado para
Número de frames	30
Contraste mínimo	60 pixels
Tamanho mínimo da célula	3 pixels
Contraste para células estáticas	30 pixels
Linearidade	80%
Média mínima para VAP	30.0 µm/Segundo
Mínimo VAP para células progressivas	70.0 µm/Segundo
Mínimo VSL para células lentas	20.0 µm/Segundo
Tamanho de cabeças estáticas	0.62 – 2.98
Intensidade de cabeças estáticas	0.24 – 1.19
Elongação de cabeças estáticas	100 – 0
Magnificação	1.95×
Temperatura	37°C

176

177 **2.6.2 Integridade da membrana plasmática por microscopia de epifluorescência**

178 A avaliação da integridade de membrana plasmática (IMP, %) foi efetuada por
179 microscopia de epi-fluorescência (Leica Microsystem – DMLB, Alemanha) pela
180 associação das sondas fluorescentes iodeto de propídio e diacetato de 6-
181 carboxifluoresceína [9].

182

183 **2.7 Formação dos grupos experimentais**

184 Após o processamento das amostras foram formados os seguintes grupos
185 experimentais: amostras a fresco e congeladas de espermatozoides do ejaculado,
186 espermatozoides epididimários da cabeça, corpo e cauda.

187 **2.8 Obtenção e cultivo das células da tuba uterina**

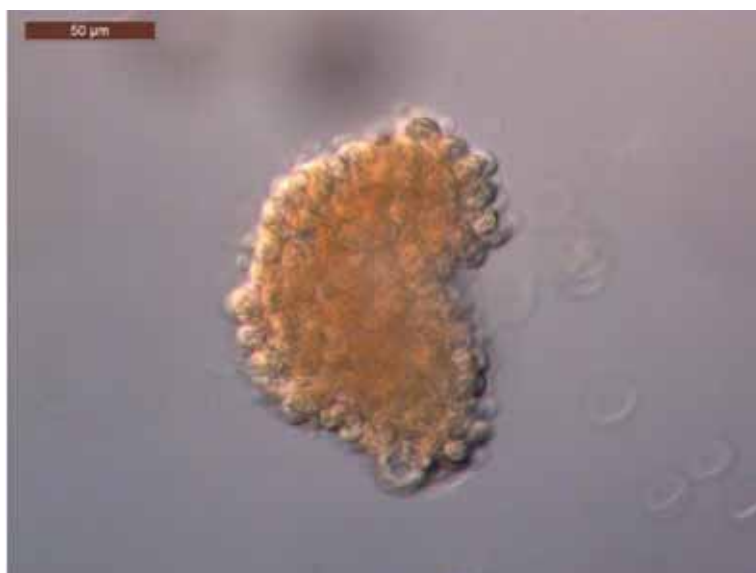
188 Para obtenção das células epiteliais da tuba uterina foram utilizados tubas
189 uterinas bovinas, conforme técnica descrita por Samper et al. [10]. As tubas foram
190 adquiridas em abatedouro comercial e destinados ao laboratório transportados em
191 solução fisiológica aquecida a 38,5°C por aproximadamente 40 minutos. No
192 laboratório as tubas foram lavadas com solução de Ringer com lactato de sódio
193 aquecida 37°C e as tubas uterinas separadas de ligamentos e vasos sanguíneos.
194 Após separação, estas foram depositadas em placas de Petri (60 mm) contendo
195 solução TCM199 acrescido de 10% de soro fetal bovino, 5µg/mL de insulina, 5µg/mL
196 de transferrina, 5ng/mL de selênio e 25µg/mL de sulfato de gentamicina. Cada tuba
197 uterina foi fixada individualmente pelo istmo com auxílio de uma pinça hemostática e
198 uma lâmina histológica foi utilizada para aplicar pressão por toda a extensão do
199 ducto, de forma a promover a saída das células epiteliais através da ampola.

200 O fluido celular foi então aspirado com uso de uma micropipeta de 1mL e
201 transferido para outra placa de Petri (60 mm) contendo 20 mL de solução aquecida a
202 38,5°C de TCM199 acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB), 5µg/mL de
203 insulina, 5µg/mL de transferrina, 5ng/mL de selênio e 25µg/mL de sulfato de
204 gentamicina. Os grumos celulares foram desfeitos com auxílio de agulha 25G e o
205 conteúdo foi transferido para um tubo de centrifuga. A suspensão celular foi
206 centrifugada a 200xg por 10 minutos, o sobrenadante descartado e as células
207 ressuspendidas em 10 mL do mesmo meio. O procedimento de lavagem foi repetido
208 por 2 vezes, e ao final as células foram ressuspendidas e transferidas para placa de
209 petri (60 mm).

210 As placas contendo as células da tuba uterina foram incubadas em estufa com
211 100% de humidade e 5% de CO₂ em ar a 38,5°C . Após 24 horas de cultivo, as

212 placas foram examinadas e os grupos de células que formaram agregados coesos
213 de formato tubular (*explants*) apresentando movimento devido ao batimento ciliar
214 das células da tuba uterina foram selecionados (Figura 1).

215



216

217 **FIGURA 1:** Fotomicrografia em microscópio de interferência de fase em aumento de 40x, de
218 agregado celular esférico, proveniente de células da tuba uterina, após aproximadamente 24
219 h de cultivo. Escala de 50 µm

220

221 **2.9 Preparação das amostras seminais para teste de ligação às células da tuba** 222 **uterina.**

223 Para o teste de ligação às células da tuba uterina as amostras seminais
224 foram submetidas a centrifugação de 900xg por 5 minutos para retirada do diluidor
225 em a um gradiente de densidade EquiPure™ (Nidacon, Gothenburg, Suécia). A
226 seguir, desprezou-se o sobrenadante e o “pellet” foi ressuspendido para
227 concentração de $0,5 \times 10^6$ espermatozoide/mL em meio de fertilização, constituído por
228 HTF (Irvine Scientific, Santa Ana, CA, Estados Unidos) acrescido de 5 mg/mL de
229 BSA, 11 mg/mL de piruvato de sódio, 0,5 mg/mL de cafeína, 3 mg/mL de heparina,

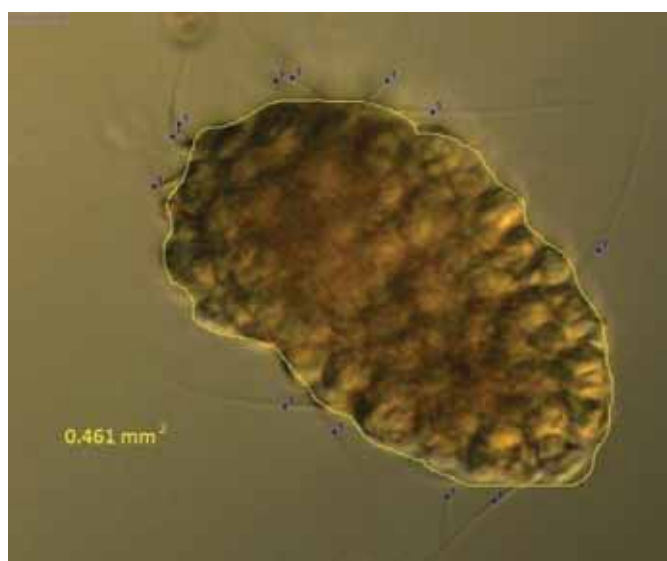
230 de 0,3 mg/mL de penicilinamina, 0,11 mg/mL de hipotaurina e 0,18 mg/mL de
231 epinefrina e 16,67 µg/µL de sulfato de amicacina.

232

233 **2.10 Teste de ligação às células da tuba uterina**

234 Para cada teste de ligação foram realizadas gotas de meio de fertilização
235 contendo 30 *explants* e $0,5 \times 10^6$ espermatozoides/mL, os quais foram incubados em
236 estufa com 100% de humidade e 5% de CO₂ em ar a 38,5°C por 30 minutos. Após a
237 incubação, os complexos *explants*-espermatozoides foram transferidos para uma
238 lâmina de vidro para captura das imagens. Para cada complexo *explants*-
239 espermatozoide foram feitas duas imagens utilizando o microscópio de interferência
240 de fase (Leica DM 2500, Differential Interference Contrast – DIC, Heerbrugg, Suíça)
241 com câmara digital acoplada. O número de espermatozoides ligados e o perímetro
242 de cada agregado, foi avaliado utilizando o software de edição de imagens ImageJ.
243 Esses parâmetros foram então utilizados para calcular o número de
244 espermatozoides ligados por milímetro quadrado (mm²) de agregado, dividindo o
245 número de espermatozoides aderidos pela área do *explant* (Figura 2).

246



247

248 **FIGURA 2:** Fotomicrografia em microscópio de interferência de fase em aumento de 40x, do
249 complexo agregado-espermatozoide, após 30 minutos de co-incubação com os
250 espermatozoides. Contagem manual dos espermatozoides (marcados com pontos azuis) e
251 medição do perímetro do agregado (linha em amarelo) para avaliação do número de
252 espermatozoides ligados por milímetro quadrado (mm^2) de agregado. Escala de 50 μm
253

254 **2.11 Análise Estatística**

255 Os resultados foram avaliados pelo programa computacional InStat 5.0
256 (GraphPad Software Inc, USA). Para comparação dos valores dos parâmetros
257 espermáticos e da taxa de ligação dos espermatozoides às células epiteliais da tuba
258 uterina foi efetuado análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey quando
259 necessário entre os grupos. Já para avaliação do efeito da congelação para as
260 mesmas variáveis foi utilizado o test t Student. Diferenças significativas foram
261 consideradas quando $p < 0,05$.

262

263 **3. RESULTADOS**

264 Em relação aos valores de cinética espermática das amostras a fresco, o
265 sêmen do ejaculado apresentou MT e RAP semelhantes aos valores obtidos pelos
266 espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo, entretanto em relação a MP

267 os espermatozoides do ejaculado apresentaram valores superiores aos demais
268 grupos estudados. Já a IMP todos os grupos apresentaram valores similares, com
269 exceção dos espermatozoides recuperados da cabeça do epidídimo os quais
270 demonstraram valores inferiores aos demais grupos para todas as características
271 espermáticas estudadas.

272 Nas amostras congeladas, os valores de cinética espermática foram superiores
273 no grupo dos espermatozoides provenientes do ejaculado, sendo que os
274 espermatozoides recuperados do corpo e da cauda do epidídimo apresentaram
275 valores significativamente maiores aos da cabeça. Entretanto, para IMP não houve
276 diferença significativa entre os grupos, exceto para os espermatozoides
277 provenientes da cabeça do epidídimo os quais apresentaram valores
278 significativamente inferiores aos demais grupos.

279 Quanto ao efeito da congelação sobre as características de movimentação
280 espermática dentro de cada grupo estudado, com exceção dos valores obtidos para
281 os espermatozoides da cabeça do epidídimo, todos os demais grupos obtiveram
282 valores significativamente superiores para amostra do sêmen fresco em relação às
283 amostras descongeladas. Entretanto, para IMP todos os valores observados após a
284 descongelação foram inferiores aos obtidos antes da congelação, conforme
285 resultados observados na Tabela 1.

286

287

288

289

290

291 **TABELA 1:** Média e erro padrão da cinética espermática e integridade de membrana
 292 plasmática dos espermatozoides provenientes do ejaculado e do epidídimo (cabeça, corpo e
 293 cauda), a fresco e congelado.

Variáveis	MT(%)	MP(%)	RAP(%)	IMP(%)
Fresco				
Ejaculado	78,6 ± 2,6 ^{Aa}	38,7 ± 4,1 ^{Aa}	70,1 ± 3,4 ^{Aa}	62 ± 1,4 ^{Aa}
Cabeça	3,4 ± 1,0 ^{Ca}	0,9 ± 0,3 ^{Ca}	1,4 ± 0,5 ^{Ca}	39 ± 1,4 ^{Ba}
Corpo	56,2 ± 3,8 ^{Ba}	19,5 ± 2,5 ^{Ba}	44,1 ± 3,9 ^{Ba}	61 ± 1,7 ^{Aa}
Cauda	64,7 ± 5,5 ^{ABa}	22,4 ± 3,8 ^{Ba}	51,0 ± 6,5 ^{ABa}	59 ± 1,2 ^{Aa}
Congelado				
Ejaculado	45,6 ± 5,1 ^{Ab}	21,1 ± 4,1 ^{Ab}	33,0 ± 6,0 ^{Ab}	33 ± 4,6 ^{ABb}
Cabeça	1,1 ± 0,5 ^{Ca}	0,3 ± 0,1 ^{Ba}	0,3 ± 0,1 ^{Ba}	3 ± 1,1 ^{Cb}
Corpo	14,4 ± 3,9 ^{Bb}	3,6 ± 0,6 ^{Bb}	6,3 ± 1,2 ^{Bb}	27 ± 3,6 ^{Bb}
Cauda	19,1 ± 5,4 ^{Bb}	5,8 ± 1,7 ^{Bb}	14,3 ± 7,5 ^{Bb}	37 ± 1,9 ^{Ab}

294 Motilidade Total (MT), Motilidade Progressiva (MP), Espermatozoides Rápidos
 295 (RAP), Integridade da Membrana Plasmática (IMP).

296 ^{ABC} Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem em (p<0,05).

297 ^{ab} Letras minúsculas diferentes para mesma variável, sêmen fresco e
 298 congelado, diferem em (p<0,05).

294
 295
 296
 297
 298
 299

300 Com relação ao número de espermatozoides ligados aos *explants* da tuba
 301 uterina, houve um aumento gradativo da taxa de ligação da cabeça para cauda do
 302 epidídimo. Não foi observada nenhuma adesão dos espermatozoides provenientes
 303 da cabeça do epidídimo e os espermatozoides recuperados do corpo e da cauda
 304 apresentaram valores de adesão semelhantes entre si e inferiores aos observados
 305 para os espermatozoides do ejaculado.

306 Quando comparado o efeito do processo de congelação sobre a taxa de
 307 adesão, não foi observada diferença entre o mesmo grupo a fresco e congelado,
 308 conforme dados Tabela 2.

309
 310
 311
 312

313 **TABELA 2:** Valores médios e erro padrão de ligação dos espermatozoides a fresco e
314 congelado, por milímetro quadrado de área do *explant* das células epiteliais da tuba uterina.
315

Grupo	Ejaculado (SPTZ/mm ²)	Cabeça (SPTZ/mm ²)	Corpo (SPTZ/mm ²)	Cauda (SPTZ/mm ²)
Sêmen Fresco	88.2±13.5 ^{Aa}	0±0 ^{Ac}	6.7±1.9 ^{Ab}	17.8±9.4 ^{Ab}
Sêmen Congelado	72.8±6.8 ^{Aa}	0±0 ^{Ac}	9.8±1.2 ^{Ab}	17.7±2.3 ^{Ab}

316 ^{abc} Letras diferentes na mesma linha diferem em p<0,05.

317 ^A Letras diferentes na mesma coluna diferem em p<0,05.

318

319

320 **4. DISCUSSÃO**

321 Embora fisiologicamente a adesão do espermatozoide aos reservatórios
322 uterinos exerça importante papel no mecanismo de seleção e preservação
323 espermática, recentes publicações relataram que espermatozoides provenientes da
324 cauda do epidídimo utilizados em inseminação artificial apresentaram taxas de
325 fertilidade similar às obtidas utilizando espermatozoides provenientes do ejaculado
326 [6, 7, 17, 21].

327 A ausência de contato desses espermatozoides com o plasma seminal implica
328 na não incorporação de proteínas essenciais que possibilitam estas células
329 desencadarem esta função. Assim sendo, a permanência desses espermatozoides
330 no trato genital feminino pode estar comprometida [2,1]

331 No presente estudo foi verificado que as características da cinética espermática
332 para espermatozoides a fresco é similar para os parâmetros MT e RAP quando se
333 comparou as células espermáticas recuperadas da cauda e do corpo do epidídimo,
334 após a adição do diluente de congelação, com os do ejaculado, demonstrando que
335 os espermatozoides apresentaram uma capacidade de movimentação adequada
336 para o deslocamento durante seu trajeto pelo trato reprodutor feminino. Estes
337 resultados se assemelham aos estudos realizados por outros autores [6, 11-13].

338 Outra característica observada foi que a partir do segmento do corpo do
339 epidídimo, os espermatozoides já possuem IMP similar as observadas após
340 ejaculação. Essa integridade estrutural é importante para que a célula espermática
341 desencadeie todos os processos bioquímicos fundamentais para sua sobrevivência
342 no trato reprodutor feminino e posteriormente seja capaz de realizar a fecundação
343 [14].

344 Os resultados referente aos espermatozoides recuperados da cabeça do
345 epidídimo demonstraram que a maturação espermática nesse segmento se encontra
346 em um estágio onde essas células não possuem ainda a capacidade de expressar
347 sua movimentação, mesmo após o contato com substâncias estimulantes presentes
348 no diluidor de congelação, e cerca de 60% desses espermatozoides apresentaram
349 uma deficiente integridade em relação a sua membrana plasmática. Tal fato é
350 reforçado por outros estudos [15, 16] que relataram que a capacidade de
351 movimentação progressiva e mudanças na composição lipídica da membrana
352 espermática ocorrem especificamente a partir da região do corpo, devido ao seu
353 ambiente bioquímico.

354 Para que a utilização dos espermatozoides recuperados do epidídimo seja
355 aplicada de forma eficiente, o procedimento de congelação espermática se
356 apresenta como fundamental para a preservação dessas células durante um período
357 adequado até sua utilização, haja vista que se essas células espermáticas não
358 forem congeladas sua viabilidade seria de no máximo 48 a 72 horas [17]. Como o
359 processo de criopreservação é extremamente agressivo para o espermatozoide, foi
360 verificado que as características de cinética e IMP foram significativamente
361 reduzidas após a descongelação, tanto para espermatozoides do ejaculado como os
362 recuperados do epidídimo, corroborando com outros autores [18, 19] que afirmaram

363 que o processo de congelação e descongelação provocaram uma redução na
364 motilidade e alteração da capacidade de fertilização por alterações na membrana
365 plasmática da célula.

366 Entretanto, os valores de cinética observados entre os espermatozoides
367 descongelados do ejaculado e os do corpo e cauda do epidídimo diferiram
368 significativamente, contrastando com estudos em equinos [6, 11, 20, 21] e suínos
369 [22, 23], os quais relataram que os valores de cinética espermática e IMP após a
370 congelação dos espermatozoides do ejaculado e do epidídimo são similares [19].

371 Após a descongelação, os espermatozoides do epidídimo provavelmente
372 seriam insatisfatórios para uma possível utilização em inseminação artificial, devido
373 a uma baixa motilidade total e deslocamento progressivo. Esses resultados se
374 assemelham a estudos anteriores conduzidos em diferentes espécies como bovinos
375 [24], humanos [25] e equinos [26], entretanto contrasta com resultados de estudos
376 de taxa de fertilidade em equinos [6, 7, 17, 21].

377 Os espermatozoides recuperados do corpo e da cauda do epidídimo
378 apresentaram valores similares em relação à cinética espermática pós
379 descongelação, entretanto foi verificado que a sensibilidade dos espermatozoides
380 provenientes do corpo epididimário foi maior do que os da cauda, possivelmente
381 este fato seja explicado devido a essas células se encontrarem em um estágio de
382 maturação mais precoce [14].

383 A utilização de sêmen congelado é uma ferramenta importante na reprodução
384 assistida, em particular, para a indústria de biotecnologia equina [12], entretanto
385 poucos estudos foram direcionados a verificação da capacidade dessas células em
386 se aderirem aos reservatórios espermáticos.

387 Neste sentido, um maior entendimento desse processo pode permitir à
388 adequação de alguns fatores inerentes a inseminação artificial como a dose
389 inseminante utilizada e o momento da inseminação artificial, haja vista que esses
390 espermatozoides podem permanecer viáveis por um menor período no trato genital
391 da égua [2].

392 Ao verificar a taxa de adesão espermática aos *explants* da tuba uterina, os
393 espermatozoides do ejaculado apresentaram uma maior taxa de adesão, quando
394 comparado aos espermatozoides provenientes do epidídimo, resultado semelhante
395 ao reportado em outro estudo com suínos [27]. Provavelmente, este resultado
396 ocorreu pelo fato dos espermatozoides do ejaculado entrarem em contato com as
397 secreções das glândulas anexas, responsáveis pela secreção de grande quantidade
398 de proteínas, principalmente as lecetinas que são importantes para adesão dos
399 espermatozoides às células epiteliais da tuba uterina [1, 28, 29].

400 De acordo com estudos anteriores, a criopreservação do sêmen equino causa
401 danos subletais ao espermatozoide [30], levando a uma diminuição no número de
402 espermatozoides com capacidade de adesão às células da tuba uterina [27]. Porém
403 neste estudo não foi encontrada diferença entre a taxa de adesão do
404 espermatozoide a fresco com o espermatozoide congelado, confrontando com
405 estudos reportados por outros autores [31, 32] que observaram uma diminuição na
406 taxa de adesão dos espermatozoides congelados às células epiteliais da tuba
407 uterina *in vitro*.

408 Estudos em bovinos observaram que após o processo de congelação-
409 descongelação as proteínas responsáveis pela adesão dos espermatozoides na
410 tuba uterina reduzem seus níveis em até 70%, afetando a ligação e
411 conseqüentemente, a taxa de fecundação [24]. Porém, alguns fatores como diluidor

412 e/ou protocolo de congelamento utilizado neste trabalho provavelmente ofereceram um
413 maior suporte e proteoção às células espermáticas no processo de criopreservação
414 devido a sua composioção, quando comparado com os meios utilizados em
415 pesquisas anteriores.

416 Embora as taxas de fertilidade dos espermatozoides do epidídimo serem
417 semelhantes as do ejaculado [6, 7, 17, 21], este estudo demonstrou que
418 espermatozoides epididimários possuem taxas de adesão celular às células da tuba
419 uterina inferiores aos espermatozoides do ejaculado congelado. Possivelmente esta
420 fertilidade esta relacionada ao fato da inseminação artificial com espermatozoides do
421 epidídimo ser realizada após a ovulação, uma vez que estas células são armazenadas
422 e utilizadas na forma congelada. Porém, no uso da inseminação pré-ovulação,
423 provavelmente ocorreria uma diminuioção nas taxas de fertilização com o uso dos
424 espermatozoides provenientes do epidídimo.

425

426 **5. CONCLUSÃO**

427 A taxa de adesão dos espermatozoides do epidídimo aos *explants* de tuba
428 uterina é menor em relação ao sêmen ejaculado e o processo de congelamento
429 espermática não afeta essas ligações.

430

431 **Agradecimentos**

432 A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela bolsa
433 de estudo e auxílio financeiro concedidos para realização do projeto de pesquisa
434 (Processo: 2012/12526-4 e 2012/17320-5, respectivamente).

435

436

437 **REFERÊNCIAS**

- 438 [1] Lefebvre R, Chenoweth PJ, Drost M, LeClear CT, MacCubbin M, Dutton JT,
439 Suarez SS. Characterization of the oviductal sperm reservoir in cattle. *Biology of*
440 *Reproduction* 1995; 53:1066-1074.
- 441 [2] Troedsson MHT, Liu IKM, Crabo BG. Sperm transport and survival in the mare.
442 *Theriogenology* 1998; 49:905-915.
- 443 [3] De Pauw IMC, Van Soom A, Laevens H, Verberckmoes S, De Kruif A. Sperm
444 binding to epithelial *explants* in bulls with different non-return rates investigated with
445 a new in vitro model. *Biology of Reproduction* 2002; 67:1073–1079.
- 446 [4] Thomas PGA, Ball BA, Brinsko SP. Interaction of equine spermatozoa with
447 oviduct epithelial cell explants is affected by estrous cycle and anatomic origin of
448 explant. *Biology of Reproduction* 1994; 51:222-228.
- 449 [5] Cary JA, Madill S, Farnsworth K, Hayna JT, Duoos L, Fahning, ML. A comparison
450 of electroejaculation and epididymal sperm collection techniques in stallions. *The*
451 *Canadian Veterinary Journal* 2004; 45:35–41.
- 452 [6] Monteiro GA, Papa FO, Zahn FS, Dellaqua Junior JA, Melo CM, Mazieiro RRD,
453 Avanzi BR, Alvarenga MA, Guasti PN. Cryopreservation and fertility of ejaculated
454 and epididymal stallion sperm. *Animal Reproduction Science* 2011; 127:197-201.
- 455 [7] Papa FO, Melo CM, Fioratti EG, Dell’Aqua Jr JA, Zahn FS, Alvarenga MA.
456 Freezing of stallion epididymal sperm. *Animal Reproduction Science* 2008; 107:293-
457 301.
- 458 [8] Dell’Aqua Jr JA, Papa FO, Alvarenga MA, Zahn FS. Effect of packing systems
459 and thawing temperature on spermiatic parameters and fertility rate of frozen equine
460 semen. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 2001; 25:458-460.

- 461 [9] Harrison RAP, Vickers SE. Use of fluorescent probes to assess membrane
462 integrity in mammalian spermatozoa. *Journal Reproduction Fertility* 1990; 88:343-2.
- 463 [10] Samper J, Ellington J, Burnett K, Jones A, Wright R. Use of sperm and oviduct
464 cell co-culture as a test for stallion field fertility. *American Association of Equine*
465 *Practitioners* 1995; 41:3–5.
- 466 [11] Tiplady CA, Morris LHA, Allen WR. Stallion epididymal spermatozoa: pre-freeze
467 and post-thaw motility and viability after three treatments. *Theriogenology* 2002;
468 58:225-228.
- 469 [12] Granemann LC. Avaliação comparativa do sêmen eqüino colhido com vagina
470 artificial e por lavado intraluminal da cauda do epidídimo pós-orquiectomia. 2006.
471 48f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- 472 [13] Muradás PR, Weiss RR, Kozicki LE, Granemann LC, Santos IW, Pimpão CT.
473 Alguns parâmetros de viabilidade de espermatozoide eqüinos colhidos por vagina
474 artificial e por lavagem da cauda do epidídimo. *Archives of Veterinary Science* 2006;
475 11:69-74.
- 476 [14] Neuhauser S, Rheinfeld S, Handler J. Motility of fresh and frozen-thawed stallion
477 sperm from three segments of the epididymal cauda and the effect of post-thaw
478 seminal plasma addition on motility. *Journal of Equine Veterinary Science* 2013; 33;
479 942-949.
- 480 [15] Lindholmer C. The importance of seminal plasma for human sperm motility.
481 *Biology Reproduction* 1974; 10:542–553.
- 482 [16] Cooper TG. *The Epididymis, Sperm Maturation and Fertilization*. New York:
483 Springer-Verlag, 1986.
- 484 [17] Barker CA, Gandier SCC. Pregnancy in a mare resulting from frozen epididymal
485 spermatozoa. *Canadian Journal of Comparative Medicine* 1957; 21:47–51.

- 486 [18] Watson PF. Recent development of their post-thawing function. *Reproduction*
487 *Fertility* 1995; 7:871-891.
- 488 [19] Monteiro GA. Criopreservação e fertilidade de espermatozoides recuperados da
489 cauda do epidídimo de garanhões. Botucatu, 2010. p.27-37 Dissertação (Mestrado)
490 – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista,
491 Botucatu.
- 492 [20] Johnson L, Amann RP, Picckett BW. Maturation of equine epididymal
493 spermatozoa. *American journal Veterinary Research* 1980; 41:1190-1196.
- 494 [21] Morris L, Tiplady C, Allen WR. The in vivo fertility of cauda epididymal
495 spermatozoa in the horse. *Theriogenology* 2002; 58:643-646.
- 496 [22] Kikuchi K, Nagai T, Kashiwazaki N, Ikeda H, Noguchi J, Shimada A.
497 Criopreservation and ensuing in vitro fertilization ability of boar spermatozoa from
498 epididymides stored at 4°C. *Theriogenology* 1998; 50:615-623.
- 499 [23] Blash S, Melican D, Gavin W. Cryopreservation of epididymal sperm obtained at
500 necropsy from goats. *Theriogenology* 2000; 54:899-905.
- 501 [24] Lessard C, Parent S, Leclerc P, Sullivan R. The protein p25b: a possible
502 explanation of the lost of fertility of towed bull sperm. *Theriogenology* 1999; 51:347.
- 503 [25] Bachtell NE, Conaghan J, Turek PJ. The relative viability of human spermatozoa
504 from the vas deferens, epididymis and testis before and after cryopreservation.
505 *Human Reproduction* 1999; 14:3048-3051.
- 506 [26] Heise A, Ahn WK, Volkmann DH, Thompson PN, Gerber D. Influence of seminal
507 plasma on fertility of fresh and frozen-thawed stallion epididymal spermatozoa.
508 *Animal Reproduction Science* 2010; 118:48-53.

- 509 [27] Petrunkina AM, Gehlhaar R, Drommer W, Waberski D, Töpfer-Petersen E.
510 Selective sperm binding to pig oviductal epithelium in vitro. *Reproduction* 2001;
511 121:889–896.
- 512 [28] Töpfer-Petersen E. Carbohydrate-based interactions on the route of a
513 spermatozoon to fertilization. *Human Reproduction* 1999; 5:314–329.
- 514 [29] Suarez SS. Carbohydrate-mediated formation of the oviductal sperm reservoir in
515 mammals. *Cells, Tissues, Organs* 2002; 168:105–112.
- 516 [30] Katila T, Celebi M, Koskinen E. Effect of timing of frozen semen insemination on
517 pregnancy rate in mares. *Acta Veterinaria Scandinavica* 1996; 37:361–365.
- 518 [31] Dobrinski I, Thomas PGA, Ball BA. Cryopreservation reduces the ability of
519 equine sperm to attach to oviductal epithelial cells and zonae pellucida in vitro.
520 *Journal of Andrology*. 1995; 16:536–542.
- 521 [32] Cormier N, Sirard MA, Bailey JL. Premature capacitation of bovine sperm is
522 initiated by cryopreservation. *Journal of Andrology* 1997; 18:461–468.

NORMAS DA REVISTA

Theriogenology - Guide for Authors

Introduction

Please consult this Guide for Authors for further details on the requirements for submitting your paper to *Theriogenology*. The guidelines described in this document should be adhered to carefully, to ensure high-quality and rapid publication of your manuscript.

Theriogenology is an international, peer-reviewed journal that publishes papers regarding the study of reproduction in domestic and non-domestic mammals, birds, reptiles, and fish. *Theriogenology* publishes only material that has never been previously published and is not currently being considered for publication elsewhere; the exception would be limited disclosure (e.g. publication of an abstract or in the proceedings of a scientific conference, with limited circulation).

Types of article

1. Original Research Papers (Regular Papers)
2. Review Articles
3. Technical Notes

Original Research Papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

Review Articles should cover subjects within the scope of the journal that are of active current interest. They are usually invited, but prospective Authors may contact the Editors with proposals.

Technical Notes are concise, comprehensive descriptions of technical aspects of innovative methods (that will not be subsequently published as a full-length paper). The entire submitted manuscript typically should not exceed approximately 12 double-spaced pages.

Page Charges

This journal has no page charges.

Before You Begin

Ethics in Publishing

For information on Ethics in Publishing and Ethical guidelines for journal publication see ➔ <http://www.elsevier.com/publishingethics> and ➔ <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>

Policy and Ethics

The work described in your article must have been carried out in accordance with *The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki)* for experiments involving humans ➔

<http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; EU Directive 2010/63/EU for animal experiments ➔

http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm; *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals* ➔

<http://www.icmje.org>. This must be stated at an appropriate point in the article.

Unnecessary cruelty in animal experimentation is not acceptable to the Editors of *Theriogenology*.

Conflict of Interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also ➔ <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>

Submission Declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under current consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Contributors

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition, analysis and interpretation of data; (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content; and (3) final approval of the version to be submitted.

Changes to Authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see ➔ <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript, together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles (including abstracts) for internal circulation within their institutions. However, permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult ➔ <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases (please consult ➔ <http://www.elsevier.com/permissions>).

Retained Author Rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details see ➔ <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Role of the Funding Source

You are requested to identify the source(s) of financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in writing the report; and in the decision to submit the paper for publication. If the funding source(s) had no such involvement, this should be stated. Please see ➔ <http://www.elsevier.com/funding>.

Open Access

This journal offers authors two choices to publish their research;

1. Open Access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse

- An Open Access publication fee is payable by authors or their research funder

2. Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our access programs (<http://www.elsevier.com/access>)
- No Open Access publication fee

All articles published Open Access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution-Non Commercial-ShareAlike (CC BY-NC-SA): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY NC SA).

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC-BY-NC-ND): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

Creative Commons Attribution (CC-BY): available only for authors funded by organizations with which we have established an agreement with. For a full list please see www.elsevier.com/fundingbodies

Elsevier has established agreements with funding bodies. This ensures authors can comply with funding body Open Access requirements, including specific user licenses, such as CC-BY. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. www.elsevier.com/fundingbodies

To provide Open Access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published Open Access. Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles.

The Open Access publication fee for this journal is \$USD 2,500, excluding taxes.

Learn more about Elsevier's pricing policy

➡ www.elsevier.com/openaccesspricing

Funding Body Agreements and Policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors, whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies, please visit ➡ <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Language and language services

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit ➡ <http://webshop.elsevier.com/languageservices> or our customer support site at ➡ <http://support.elsevier.com> for more information.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online; you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail, removing the need for a paper trail. *Submit your article.*

Please submit your article via ➡ <http://ees.elsevier.com/therio>.

Referees

Please submit, as part of the covering letter with the manuscript, the names, full affiliations (department, institution, city and country) and e-mail addresses of 3 potential Referees. Appropriate Referees should be knowledgeable about the subject, but have no close connection with any of the authors. You may also suggest

reviewers you do not want to review your manuscript, but please state your reasons for doing so.

PREPARATION

Use of word-processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format and double spaced. It is important that all pages and lines are numbered. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts, etc. Do not embed "graphically designed" equations or tables, but prepare these using the word processor's facility. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. In lieu of a grid, use tabs, not spaces, to align columns. Electronic text should be prepared similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Do not import the figures into the text file; instead, indicate their approximate locations directly in the electronic text and on the manuscript. See also the section on Electronic illustrations. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the "spell-check" and "grammar-check" functions of your word processor, and to read it critically.

Article Structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1. (then 1.1.1., 1.1.2., ...), 1.2., etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to "the text". Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line, with one blank line above and below.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results. Introduction should generally not exceed 2 manuscript pages (double-spaced).

Materials and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published in a readily available source should be indicated by a reference (only relevant modifications should be described).

Results

Results should be clear and concise. If data are reported in a table or figure, the text should only highlight the information, but not repeat it in detail.

Discussion

This should explore the relevance and implications of the results of the work, not simply repeat them. A combined Results and Discussion section may be appropriate. Avoid excessive citations and discussion of published literature. Although there are always exceptions, in general the Discussion section should generally not exceed 40% of the manuscript (excluding references, figures, and tables) and there should be no more than 35 references (except for review papers).

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 a

Results and Discussion section.

Essential title page information

Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations, trade names, and formulae.

Author names and affiliations. Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. First names or initials can be used according to author preference. 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 is willing to handle correspondence at all stages of review 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. Since an abstract is often presented separately from the article, it must be able to stand alone. For this reason, references should generally be avoided, but if essential, they must be cited in full, without reference to the reference list. Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if their use is essential, they must be defined at their first mention in the abstract itself. Abstracts must be limited to a single paragraph with no more than 2,500 keystrokes (characters plus spaces).

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"). Some keywords may be identical to words used in the title, but consideration should be given to keywords which are complimentary to words used in the title (to facilitate retrieval of your article from electronic databases). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field should be used. These keywords will be used for indexing purposes.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references; therefore, do not include them on the title page, as a footnote to the title, etc..List individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.), sources of financial support, and donations of products and materials.

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). Please see *Additional Style Notes* below.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many word processors 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

Image manipulation Although it is generally accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork. Avoid excessively large fonts.
- For labels on figures, both those on the figure axes as well as those directly on the figure, capitalize only the first letter of the first word.
- Do not prepare a figure to communicate very limited data that could easily be included in the text of the Results.
- 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 finalized, 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.

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is'.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g.,
- 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. Information regarding the cost of color reproduction in print will be sent by Elsevier after your article has been accepted. 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: Since technical complications can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version, should you not opt for color in print), if you have any figures with color that will not be published in color in the printed version, please submit two versions (color and usable black and white).

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Text graphics

Present incidental graphics not suitable for mention as figures, plates or schemes at the end of the article and number them "Graphic 1", etc. Their precise position in the

text can then be indicated. See further information under Electronic artwork. If you are working with LaTeX and have such features embedded in the text, these can be left, but such embedding should not be done specifically for publishing purposes. Further, high-resolution graphics files must be provided separately.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

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.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given. 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.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given. Example: "...as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result..."

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they first appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2010;163:51-9.

Reference to a book:

[2] Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 4th ed. New York: Longman; 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. *Introduction to the electronic age*, New York: E-Publishing Inc; 2009, p. 281-304.

Note shortened form for last page number. e.g., 51-9, and that for more than 6 authors, the first 6 should be listed followed by 'et al.' For further details, you are referred to 'Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals' (*J Am Med Assoc* 1997;277:927-34) (see also http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>;

List of serial title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>;

CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>.

Do not abbreviate a journal name which is a single word, or is in a language other than English.

Supplementary material

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer authors additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips, etc. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: ➔ <http://www.sciencedirect.com>. 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>.

Additional style notes

Please use the following words, phrases, abbreviations, and stylistic conventions

- Avoid the word "injected," (e.g., "Cows were injected with cloprostenol") but include the generic name, proprietary name, dosage and route of administration (e.g., "Cows were treated with cloprostenol [Estrumate 500 ?g im]").
- Either cite a P value (recommended for Abstract and for Results) or use the term 'significant' (recommended for Discussion), but generally avoid doing both.
- Terms with a specific statistical meaning (i.e. significant, tended and correlated), should only be used in a strict statistical context.
- Numbers less than 10 are written as a word, unless followed by an abbreviation for unit of measure, e.g. five embryos, 5 min

Use the following expressions

- transrectal palpation, not rectal palpation
- nucleus transfer, not nuclear transplant
- estrus (noun) synchronization, but, estrous (adjective) behavior
- sperm can be used as both noun and adjective
- 120 to 125, not 120-125
- treatment by period, not treatment X period
- gravity: 100 X g (in lieu of speed for centrifugation)
- magnification: X 100
- identification number of an animal: No. 10, but 30 animals: n = 30
- 3 d, Day 3 (define Day 0)

Standard definitions

- oogonium: female gamete before meiosis
- oocyte, primary: female gamete from onset of the first maturation division (meiosis) to extrusion of the first polar body
- oocyte secondary: female gamete from onset of second meiosis to extrusion of the second polar body
- ovum: female gamete from the end of both meiotic divisions until the union of the male and female pronuclei (differs from the common use of ovum as a general term for any female gamete)
- germinal vesicle: nucleus of the ovum
- zygote: a fertilized ovum, from fusion of the male and female gamete to completion of first cleavage
- embryo: a conceptus from the 2-cell stage to the stage when cell migration and differentiation are largely complete
- fetus: a conceptus after organogenesis is mostly complete (primarily increasing in size)
- conceptus: an embryo or fetus with all its membranes and accessory structures
- abortion: expulsion of a conceptus incapable of independent life
- premature parturition: expulsion (before full term) of a conceptus capable of independent life

- stillbirth: avoid this term (use fetal death or abortion)

Abbreviations

Never use an abbreviation to start a sentence. Some abbreviations may be used anywhere else, including the manuscript's title and in figures, table titles and legends, without definition; others may not be used in the title, but may be used in the text without definition. In general, abbreviations must be defined when used for the first time (this may be avoided in the ABSTRACT if necessary to conserve space). To make reading the paper more pleasant, avoid using excessive abbreviations and acronyms; instead use short synonyms, for instance: for "Cesarean section" instead of "CS" use "section" or "hysterotomy." The following abbreviations may be used in the text without definition (note that abbreviations exclude periods):

AI	ANOVA	ADP	ATP	BSA
cAMP	CL	DEAE-cellulose	DMSO	DNA
eCG	EDTA	EGF	ELISA	FSH
GH	GnRH	hCG	HEPE	ShMG
IVC	IVF	IVM	LH	MOET
MSH	mRNA	NAD	NADH	PBS
PGF2 α	PGFM	PIPES	PRID	PRL
RIA	RNA	SDS-PAGE	SCNT	TRH
TRIS	tRNA	TSH		

Units of Measure

cpm - counts per min
 dpm - disintegrations per min
 g - gram
 ga - gauge of hypodermic needle
 h – hour
 kg – kilogram
 L – liter
 mL - milliliter
 μ L - microliter
 m – meter
 min – minute
 mo - month
 s - second

v:v - volume ratio
 wk - week
 wt/vol - weight per volume
 y - year

Routes of treatment

id – intradermal
 im – intramuscular
 iu – intrauterine
 iv – intravenous
 sc – subcutaneous
 po - oral

Statistical expressions

ANOVA - analysis of variance

CV - coefficient of variation

df - degrees of freedom

F - variance ratio

NS - not significant

P – probability

SD - standard deviation

SEM - standard error of the mean

r - correlation coefficient

r^2 - coefficient of regression

Additional information

- For issues of style and format not addressed here, please consult *Scientific Style and Format: The CBE Manual for Authors, Editors, and Publishers, Sixth Edition*.
- For spelling, word formation and divisions, plurals, possessives, meanings and usage, consult the *CBE Manual* or a current English language (collegiate-level or higher) dictionary.
- For conflicts between instructions in this Guide and any of the references, the Guide takes precedence. Do not hesitate to contact the Editorial Office if you have any questions regarding preparation of your manuscript.

Submission Checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this *Guide for Authors* for further details regarding any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

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

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked' (and critically read and reviewed)
- 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://support.elsevier.com](http://support.elsevier.com).

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information.

The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*):

doi:10.1016/j.physletb.2003.10.071

When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, they are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address, then paper proofs will be sent by post), or a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from [⇒ http://get.adobe.com/reader](http://get.adobe.com/reader). Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are on the Adobe site: [⇒ http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html](http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html).

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections

(including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and send by e-mail or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately - please let us have all your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that if no response is received, Elsevier may proceed with publication of your article.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

AUTHOR INQUIRIES

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at ➔ <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs (➔ <http://www.elsevier.com/authorFAQ>) and/or contact Customer Support via ➔ <http://support.elsevier.com>.

Updated January 2012

Copyright © 2014 [Elsevier](#) Inc. All rights reserved. | [Privacy Policy](#) | [Terms & Conditions](#) | [Feedback](#) | [About Us](#) | [Help](#) | [Contact Us](#)

The content on this site is intended for health professionals.

Advertisements on this site do not constitute a guarantee or endorsement by the journal, Association, or publisher of the quality or value of such product or of the claims made for it by its manufacturer.