

## FERTILIDADE DE ESPERMATOZÓIDES RECUPERADOS DA CAUDA DO EPIDÍDIMO DE GARANHÕES SUBFÉRTEIS

Gabriel Augusto Monteiro<sup>1</sup>  
Frederico Ozanam Papa<sup>2</sup>  
Priscilla Nascimento Guasti<sup>1</sup>  
Natalia Pereira Paiva Freitas<sup>3</sup>  
Cely Marini Melo<sup>1</sup>  
Bruno Ribeiro Avanzi<sup>1</sup>  
Nina Miglioranza Velloso<sup>1</sup>  
José Antonio Dell'aqua Junior<sup>1</sup>

### RESUMO

A colheita de espermatozóides do epidídimo visa à recuperação de células espermáticas de garanhões de alto valor genético que forem a óbito, eutanasiados ou com processos obstrutivos que impossibilitem colheita de sêmen. No entanto, acredita-se que garanhões com baixa viabilidade espermática podem também beneficiar-se desta técnica visto que os espermatozóides não têm contato com o plasma seminal (PS) que possui efeito deletério. O objetivo do presente estudo foi comparar a viabilidade espermática entre os espermatozóides do ejaculado (Grupo 1, G1) e da cauda do epidídimo (Grupo 2, G2) de garanhões subfêrteis, além de avaliar a fertilidade de espermatozóides da cauda do epidídimo após descongelação. Foram utilizados dois garanhões subfêrteis da raça Mangalarga Machador e com histórico de subfertilidade. No G1 foram colhidos três ejaculados de cada animal e congelados com Botu-Crio<sup>®</sup>. Uma semana após a colheita do último ejaculado, os garanhões foram submetidos à orquiectomia bilateral e realizada a colheita dos espermatozóides da cauda do epidídimo de ambos os testículos pela técnica de fluxo retrógrado (G2) utilizando Botu-Sêmen<sup>®</sup> para lavagem e Botu-Crio<sup>®</sup> para congelamento espermático. Para o teste de fertilidade, foram inseminadas 8 éguas com espermatozóides descongelados provenientes do G2. Imediatamente após a detecção da ovulação, as éguas foram inseminadas com  $800 \times 10^6$  espermatozóides ( $400 \times 10^6$  de cada garanhão) na extremidade do corno uterino. O número médio de espermatozóides recuperados no G1 e G2 foi  $6,9 \pm 3,37^b$  e  $20,4 \pm 5,37^a \times 10^9$ , respectivamente. Os parâmetros espermáticos foram analisados por ANOVA seguido por Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Os valores médios nos respectivos grupos 1 e 2 pré-congelamento foram: a) Motilidade Total (MT):  $16,0 \pm 6,16^b$ ;  $66,5 \pm 6,24^a$ ; b) Motilidade Progressiva (MP):  $4,5 \pm 2,52^b$ ;  $26,3 \pm 7,93^a$ ; c) Espermatozóides rápidos (RAP):  $7,7 \pm 4,27^b$ ;  $48,8 \pm 5,38^a$ ; d) Integridade de Membrana Plasmática (IMP):  $26,8 \pm 12,36^a$ ;  $46,3 \pm 19,87^a$ ; e após descongelamento foram: a) MT:  $7,7 \pm 2,22^b$ ;  $33,3 \pm 2,06^a$ ; b) MP:  $1,8 \pm 1,26^b$ ;  $12,5 \pm 3,32^a$ ; c) RAP:  $2,0 \pm 1,41^b$ ;  $19,3 \pm 1,26^a$ ; d) IMP:  $22,3 \pm 6,02^b$ ;  $41,8 \pm 10,59^a$ . Os parâmetros espermáticos (MT e RAP) antes e após a congelamento foram maiores no G2. Os espermatozóides recuperados da cauda do epidídimo não tiveram contato com o PS que pode ser uma possível causa da melhor viabilidade espermática no G2. A taxa de concepção obtida no G2 foi de 25% (2/8). Baseado nos resultados, pode-se concluir que a colheita de espermatozóides da cauda do epidídimo de animais com baixa viabilidade espermática proporcionou a recuperação de células espermáticas com MT e RAP superiores

<sup>1</sup> Pós graduando do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP/Botucatu/Brasil, monteiroga@yahoo.com.br

<sup>2</sup> Professor Titular do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP/Botucatu/Brasil, papa@fmvz.unesp.br

<sup>3</sup> Pós graduanda do Departamento de Clínica Veterinária – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP/Botucatu/Brasil, netfreitas7@yahoo.com.br

ao sêmen do ejaculado. Além disso, a taxa de concepção de 25% demonstra que os espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo pós-descongelamento foram competentes na fertilização do oócito. Este estudo demonstra a possibilidade de obtenção de produtos de ganhos subfêrteis a partir de espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo. Entretanto, pesquisas devem ser realizadas com o objetivo de identificar possíveis ações deletérias do PS sobre a qualidade espermática de ganhos subfêrteis e infêrteis.

**Palavras chave:** ganhão, sêmen, epidídimo, criopreservação, biotecnologia

## FERTILITY OF EPIDIDYMAL CAUDA SPERM FROM SUBFERTILE STALLIONS

### ABSTRACT

Epididymal sperm harvest aims the recovery of genetic material from valuable stallions that gone dead, euthanized or with obstructive processes. However, subfertile stallions may also benefit from this technique, since epididymal sperm has no contact with potentially deleterious seminal plasma (SP). The goal of the present study was to compare sperm viability between ejaculated (Group 1, G1) and epididymal cauda sperm (Group 2, G2) and to test fertility of epididymal sperm post-thaw from subfertile stallions. Two stallions from Mangalarga Marchador breed with history of subfertility were used. Three ejaculates from each stallion were collected and frozen in G1. One week later the stallions were castrated and sperm were harvested from epididymis using retrograde flushing (G2) with Botu-Sêmen<sup>TM</sup> and then frozen with Botu-Crio<sup>TM</sup>. For fertility trial, 8 mares were inseminated with post-thawed epididymal sperm from G2. Immediately after the detection of ovulation, mares were inseminated with  $800 \times 10^6$  sperm ( $400 \times 10^6$  from each stallion) in tip of uterine horn. All sperm parameters were analyzed by ANOVA followed by Tukey's test to identify significant differences ( $p < 0.05$ ). Sperm concentration obtained in G1 and G2 were, respectively:  $6.9 \pm 3.37^b$  e  $20.4 \pm 5.37^a \times 10^9$ . Sperm parameters for G1 and G2 before freezing were, respectively: a) Total Motility (TM):  $16.0 \pm 6.16^b$ ;  $66.5 \pm 6.24^a$ ; b) Progressive Motility (PM):  $4.5 \pm 2.52^b$ ;  $26.3 \pm 7.93^a$ ; c) Rapid Sperm (RAP):  $7.7 \pm 4.27^b$ ;  $48.8 \pm 5.38^a$ ; d) Plasma Membrane Integrity (PMI):  $26.8 \pm 12.36^a$ ;  $46.3 \pm 19.87^a$ ; frozen-thawed parameters were: a) TM:  $7.7 \pm 2.22^b$ ;  $33.3 \pm 2.06^a$ ; b) PM:  $1.8 \pm 1.26^b$ ;  $12.5 \pm 3.32^a$ ; c) RAP:  $2 \pm 1.41^b$ ;  $19.3 \pm 1.26^a$ ; d) PMI:  $22.3 \pm 6.02^b$ ;  $41.8 \pm 10.59^a$ . Sperm parameters (TM and RAP) before and after freezing were superior in G2. Sperm harvested from epididymal cauda were not in contact with SP, which can be one of the possible causes of G1 increase on sperm viability. The conception rate obtained in G2 was 25% (2/8). Based on these results, we can conclude that harvesting sperm from epididymal cauda of stallions with poor semen viability has increased on TM and RAP when compared to the ejaculate. Moreover, pregnancy rates of 25% demonstrate that post-thawed epididymal cauda sperm were able to fertilize the oocyte. This result demonstrates the possibility to obtain foals from epididymal cauda sperm of subfertile stallions. However, more studies are necessary to identify the possible detrimental effects of SP on semen quality of infertile and subfertile stallions.

**Keywords:** stallion, semen, epididymis, cryopreservation, technology

## LA FERTILIDAD DE ESPERMATOZOIDEOS RECUPERADOS DE LA COLA DEL EPIDÍDIMO DE GARAÑONES SUBFÉRTILES

### RESUMEN

La recolección de espermatozoides del epidídimo tiene por objetivo la recuperación de espermatozoides de alto valor genético de los garañones que han fallecido, fueran

eutanasiados o tienen procesos obstructivos que no permiten la recogida de esperma. Sin embargo, se cree que garañones con baja viabilidad espermática pueden también beneficiarse de esta técnica, ya que los espermatozoides no tienen ningún contacto con el plasma seminal (SP) que tiene un efecto nocivo. El objetivo de este estudio fue comparar la viabilidad espermática entre el espermatozoide eyaculado (grupo 1, G1) y de la cola del epidídimo (Grupo 2, G2) de garañones subfértiles, además de evaluar la fertilidad de los espermatozoides de la cola del epidídimo después de la descongelación. Se utilizaron dos garañones subfértiles de la raza Mangalarga Marchador con histórico de su fertilidad. En G1 fueron colectados tres eyaculados de cada animal que fueran congelados en Botu-Crio®. Una semana después de la última colecta de semen, los garañones fueran sometidos a la orquiectomía bilateral y se realizó la colecta de espermatozoides de ambos cola del epidídimo con la técnica de flujo retrógrado (G2), utilizando el Botu-Sêmen® para el lavado y el Botu-Crio® para la congelación espermática. Para la prueba de fertilidad, ocho yeguas fueran inseminadas con semen congelado del G2. Inmediatamente después de la detección de la ovulación, las yeguas fueran inseminadas con  $800 \times 10^6$  de espermatozoides ( $400 \times 10^6$  de cada garañón) en el extremo del corno uterino. El número medio de espermatozoides recuperados en G1 y G2 fue  $6,9 \pm 3,37^b$  e  $20,4 \pm 5,37^a \times 10^9$ , respectivamente. Los parámetros espermáticos fueran analizados por ANOVA seguido del teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Los valores medios en los respectivos grupos 1 y 2 antes de la congelación fueron: a) la motilidad total (TM):  $16,0 \pm 6,16^b$ ;  $66,5 \pm 6,24^a$ , b) la motilidad progresiva (MP):  $4,5 \pm 2,52^b$ ;  $26,3 \pm 7,93^a$ , c) los espermatozoides rápidos (RAP):  $7,7 \pm 4,27^b$ ;  $48,8 \pm 5,38^a$ , d) la integridad de membrana plasmática (IMP):  $26,8 \pm 12,36^a$ ;  $46,3 \pm 19,87^a$ , y después de la descongelación fueran: a) MT:  $7,7 \pm 2,22^b$ ;  $33,3 \pm 2,06^a$ , b) MP:  $1,8 \pm 1,26^b$ ;  $12,5 \pm 3,32^a$ , c) RAP:  $2 \pm 1,41^b$ ;  $19,3 \pm 1,26^a$ , d) IMP:  $22,3 \pm 6,02^b$ ;  $41,8 \pm 10,59^a$ . Los parámetros espermáticos (MT y el RAP) antes y después de la congelación fueran mayores en el G2. Los espermatozoides recuperados de la cola del epidídimo no han tenido contacto con el PS, lo que puede ser una posible causa de la mejor viabilidad espermática en el G2. La tasa de concepción obtenida en el G2 fue del 25% (02/08). Con base en estos resultados, podemos concluir que la recolección de espermatozoides de la cola del epidídimo de animales con baja viabilidad espermática proporcionó una recuperación de células espermáticas con MT y RAP superior del semen eyaculado. Además, la tasa de concepción del 25% demuestra que, después de la descongelación, los espermatozoides recuperados del epidídimo fueran competentes en la fertilización del óvulo. Este hallazgo demuestra la posibilidad de obtener productos de garañones subfértiles a partir de espermatozoides recuperados de la cola del epidídimo. Sin embargo, otras investigaciones deben ser realizadas con el objetivo de identificar posibles acciones perjudiciales de la PS en la calidad del esperma de garañones subfértiles e infértiles.

**Palabras-clave:** Semental, semen, epidídimo, criopreservación, biotecnología

## INTRODUÇÃO

A morte inesperada, processos obstructivos ou distúrbios traumáticos que impossibilitem a colheita espermática podem interromper prematuramente a vida reprodutiva de garanhões de alto valor genético. Nesses casos, a recuperação de espermatozóides do epidídimo tem sido uma alternativa para a preservação do material genético destes animais.

Após a passagem pelo epidídimo, os espermatozóides sofrem várias transformações na membrana devido ao contato com a secreção proveniente das glândulas acessórias durante a ejaculação (1). Muitos estudos têm questionado a necessidade do plasma seminal no processo de fecundação, já que espermatozóides recuperados da cauda do epidídimo apresentam alta taxa de concepção (2,3). Adicionalmente, algumas pesquisas relataram que o plasma seminal pode levar a prejuízos relacionados com fertilidade e congelabilidade espermática. Estes

trabalhos demonstraram efeito deletério na viabilidade espermática quando adicionado plasma seminal (4,5). Além disso, proteínas presentes no plasma seminal podem levar a alterações bioquímicas que aumentam a permeabilidade da membrana, promovendo injúria celular (5,6). Com base nestes dados, acredita-se que garanhões subférteis e inférteis também podem beneficiar-se da técnica de recuperação espermática do epidídimo, visto que os espermatozóides não têm contato com as secreções das glândulas anexas.

A primeira prenhez obtida com a utilização de espermatozóides congelados na espécie equina foi relatada a partir de espermatozóides recuperados da cauda do epidídimo (7). Apesar da fertilidade desses espermatozóides ter sido comprovada há mais de cinco décadas, por muitos anos os estudos limitaram-se a pesquisar a preservação de espermatozóides provenientes do ejaculado.

Somente nos últimos anos alguns pesquisadores intensificaram o estudo da recuperação e preservação de espermatozóides viáveis a partir da cauda do epidídimo (2,3,8-11). 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.

Tais estudos concentram-se no desenvolvimento e aprimoramento de técnicas de colheita de espermatozóides da cauda do epidídimo (12,13), comparação de meios diluentes (2,14,15), refrigeração espermática (16), efeito da adição de plasma seminal (8,10,17-19), viabilidade espermática de garanhões subférteis (20), fertilidade (2,3,14,19), métodos de inseminação artificial (10) e injeção intracitoplasmática de espermatozóide (11).

O sucesso alcançado recentemente em equinos, com índices de fertilidade dos espermatozóides recuperados do epidídimo, mostra a importância da realização de estudos com a criopreservação destas células. Tais estudos tornam-se ainda mais relevantes quando se considera que a colheita de espermatozóides da cauda do epidídimo pode, em alguns casos, ser a última chance de preservação espermática, possibilitando com isso a obtenção de produtos de garanhões descartados da reprodução ou mesmo após a morte.

O objetivo do presente estudo foi comparar a viabilidade dos espermatozóides colhidos com vagina artificial (Grupo 1; G1) e recuperados da cauda do epidídimo (Grupo 2; G2) de garanhões subférteis, além de avaliar a fertilidade de espermatozóides da cauda do epidídimo após a descongelação.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados dois garanhões de baixa qualidade espermática, da raça Mangalarga Machador de cinco anos de idade clinicamente saudáveis e com histórico de infertilidade.

### Colheita de espermatozóides do ejaculado

No grupo 1 (G1) foram obtidos três ejaculados de cada garanhão com auxílio de vagina artificial (modelo Botucatu<sup>1</sup>) obedecendo ao intervalo de uma semana entre as colheitas.

Imediatamente após as colheitas, os ejaculados foram diluídos na proporção 1:1 com o diluente Botu-Sêmen<sup>®1</sup>, e centrifugados a 600xg por 10 minutos. Posteriormente o sobrenadante foi desprezado e o “pellet” ressuspenso com o diluente Botu-Crio<sup>®1</sup> na concentração de 200 milhões de espermatozóides viáveis por mL.

Após o envase em palhetas de 0,5 mL, as mesmas foram colocadas em geladeira Minitub<sup>®2</sup> e permaneceram na temperatura de 5°C por 20 minutos. Posteriormente, foram

<sup>1</sup> Biotech Ltda, Botucatu, Brasil.

<sup>2</sup> Minitub do Brasil LTDA.

acondicionadas em caixa isotérmica com capacidade de 45 litros, preenchida com nitrogênio líquido até a marca de 3,5 cm de altura. As palhetas foram dispostas horizontalmente a 6,0 cm acima do nível do nitrogênio líquido por 20 minutos e após este período, foram imersas no mesmo.

### **Colheita dos espermatozóides da cauda do epidídimo**

No grupo 2 (G2) uma semana após a colheita dos ejaculados, os garanhões foram submetidos à orquiectomia bilateral e realizada a colheita dos espermatozóides da cauda do epidídimo de ambos os testículos pela técnica de fluxo retrógrado (12, 21) relatada por Garde et al. (21) e Bruemmer et al. (13). Imediatamente após a retirada dos testículos e epidídimos, o tecido conjuntivo que recobre cada epidídimo foi removido e os contornos do ducto da cauda do epidídimo foram desfeitos. Em seguida, os ductos epididimários de ambos os epidídimos foram lavados injetando-se 30 mL do diluente Botu-sêmen<sup>®</sup> intraluminal, proporcionando assim que os espermatozóides fossem carregados pelo diluente. O procedimento de congelação espermática seguiu o mesmo protocolo utilizado para congelação dos espermatozóides do ejaculado.

### **Análises dos parâmetros espermáticos e integridade de membrana plasmática**

Os espermatozóides colhidos do ejaculado e da cauda do epidídimo foram avaliados pelo método computadorizado CASA (HTM-IVOS 12<sup>1</sup>) nos momentos após ressuspensão com diluente de congelação e após descongelação a 46°C por 20 segundos. Os parâmetros analisados foram: motilidade total (MT; %), motilidade progressiva (MP; %) e espermatozóides rápidos (RAP; %). Uma alíquota foi destinada à análise de integridade da membrana plasmática (IMP; %) por microscopia de epi-fluorescência (22). Além disso, a morfologia espermática foi avaliada por meio de esfregaços corados pelo método de *Karras modificado* por *Papa et al.* (23).

### **Teste de fertilidade**

No teste de fertilidade foram utilizados apenas espermatozóides provenientes da cauda do epidídimo (Grupo 2), já que os animais tinham sido utilizados em 11 inseminações com sêmen a fresco do ejaculado sem resultar em nenhuma prenhez.

Foi utilizado um ciclo de 8 éguas, mestiças, clinicamente saudáveis, com histórico reprodutivo normal. Quando constatado folículo com 35 mm foi induzida a ovulação com 2 mg de GnRH (deslorelina) e a partir deste momento as éguas foram monitoradas por ultrassonografia transretal (Pie Medical: Modelo Falcon 100 VET) até a detecção da ovulação. Imediatamente após a ovulação constatada, as éguas foram inseminadas com  $800 \times 10^6$  de espermatozóides ( $400 \times 10^6$  de cada garanhão). Para isso, o sêmen foi descongelado a 46°C por 20 segundos e posteriormente depositado na extremidade do corno uterino ipsilateral à ovulação por meio do desvio por manipulação retal da pipeta flexível (Minitub do Brasil Ltda). O diagnóstico de gestação foi realizado 14 dias após a ovulação, com auxílio do ultrassom.

---

<sup>1</sup> Hamilton Thorne Research, USA.

## Análise Estatística

Os parâmetros espermáticos foram comparados por análise de variância ANOVA (SAS Institute Inc., Cary, NC) seguida pelo teste de TUKEY. Para a análise de morfologia espermática foi utilizado o Test t de Student. O nível de significância em todas as análises foi considerado significativo quando  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O número médio de espermatozoides obtidos do ejaculado (vagina artificial; G1) e da cauda do epidídimo (G2) foi, respectivamente:  $6,9 \pm 3,37^b$  e  $20,4 \pm 5,37^a \times 10^9$ . Estes resultados são semelhantes a achados anteriores (3,24,25), nos quais o número total de espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo foi superior aos colhidos com vagina artificial.

Tabela 1. Valores médios e desvios padrão de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), espermatozoides rápidos (RAP) e integridade de membrana plasmática (IMP) dos espermatozoides do ejaculado (G1) e da cauda do epidídimo (G2) a fresco e após a descongelação.

GRUPOS	MT (%)	MP (%)	RAP (%)	IMP (%)
Epidídimo fresco	$66,5 \pm 6,24^a$	$26,3 \pm 7,93^a$	$48,8 \pm 5,38^a$	$46,3 \pm 12,36^a$
Ejaculado fresco	$16,0 \pm 6,16^c$	$4,5 \pm 2,52^{bc}$	$7,7 \pm 4,27^c$	$26,8 \pm 19,87^a$
Epidídimo descongelado	$33,3 \pm 2,06^b$	$12,5 \pm 3,32^b$	$19,3 \pm 1,26^b$	$41,8 \pm 10,59^a$
Ejaculado descongelado	$7,7 \pm 2,22^c$	$1,8 \pm 1,26^c$	$2,0 \pm 1,41^c$	$22,3 \pm 6,02^a$

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

Os parâmetros MT e RAP dos espermatozoides do epidídimo foram superiores aos espermatozoides do ejaculado, sendo compatíveis com relato anterior (4) que demonstrou efeito deletério na viabilidade espermática com a adição do plasma seminal provenientes 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 (5,6). O fato dos espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo não terem contato com o plasma seminal pode ser uma possível causa da melhor viabilidade dos espermatozoides da cauda do epidídimo quando comparado com espermatozoides do ejaculado.

Tabela 2. Valores médios e desvios padrão de defeitos morfológicos dos espermatozoides do ejaculado (G1) e da cauda do epidídimo (G2) realizados por meio de esfregaços corados pelo método de *Karras modificado*.

% Defeitos Morfológicos	Cabeça*	Peça intermediária**	Cauda***	Total
Ejaculado	$3,5 \pm 1,66^a$	$5,3 \pm 2,95^a$	$69,8 \pm 11,03^a$	$80,7 \pm 16,21^a$
Epidídimo	$3,5 \pm 3,28^a$	$6,0 \pm 0,71^a$	$44,8 \pm 10,49^b$	$54,3 \pm 10,45^b$

\* Cabeça estreita na base, cabeça subdesenvolvida, cabeça isolada patológica;

\*\* Pseudogota, edema e fratura de peça intermediária;

\*\*\* Cauda dobrada, cauda fortemente dobrada e cauda enrolada.

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

Na Tabela 2 observa-se maior porcentagem de defeitos morfológicos de cauda e totais nos espermatozóides do ejaculado quando comparado com espermatozóides da cauda do epidídimo. Estes achados diferem de resultados obtidos por Monteiro (3) em que não houve diferença na morfologia espermática entre espermatozóides do epidídimo e do ejaculado de garanhões, além de estudos realizados em bovinos por Silva et al. (26) e Martins et al. (27), que detectaram maior frequência de defeitos morfológicos em amostras do epidídimo quando confrontadas ao sêmen do ejaculado.

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que houve uma interação deletéria entre o plasma seminal e os espermatozóides, no momento da ejaculação, aumentando a porcentagem de defeitos de cauda e, conseqüentemente, queda da motilidade nos espermatozóides do ejaculado.

No presente estudo, as inseminações com espermatozóides da cauda do epidídimo após descongelação apresentaram taxa de concepção de 25%. Esta taxa de concepção é semelhante à obtida por Morris et al. (10) com espermatozóides frescos e congelados da cauda do epidídimo e inferior a obtida por Papa et al. (2) e Monteiro (3) com espermatozóides da cauda do epidídimo congelados.

Apesar de inúmeros relatos comprovando a capacidade fecundante de espermatozóides do epidídimo de garanhões, (2,3,7,10,11,14) nenhum destes trabalhos avaliou a fertilidade em garanhões subfêrteis.

## CONCLUSÕES

Com base nos resultados, pode-se concluir que os espermatozóides recuperados da cauda do epidídimo de garanhões subfêrteis mostraram-se superiores aos colhidos pela vagina artificial tanto nos parâmetros espermáticos quanto na morfologia espermática. Além disso, este estudo demonstrou a possibilidade de obtenção de produtos a partir de espermatozóides da cauda do epidídimo de garanhões subfêrteis.

## AGRADECIMENTOS

À FAPESP, pelo suporte financeiro e pela concessão da Bolsa de Doutorado.

## REFERÊNCIAS

1. Boué F, Blais J, Sullivan R. Surface localization of P34H, an epididymal protein, during maturation, capacitation, and acrosome reaction of human spermatozoa. *Biol Reprod.* 1996;54:1009-17.
2. Papa FO, Melo CM, Fioratti EG, Della'Qua JA, Zahn FS, Alvarenga MA. Freezing of stallion epididymal sperm. *Anim Reprod Sci.* 2008;107:293-301.
3. Monteiro GA. Criopreservação e fertilidade de espermatozóides recuperados da cauda do epidídimo [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2010.
4. Aurich JE, Kühne A, Hoppe H, Aurich C. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. *Theriogenology.* 1996;46: 791-7.
5. Moore HDM, Hibbit KCS. The binding of labeled basic proteins by boar spermatozoa. *J Reprod Fertil.* 1976;46:71-7.

6. Moustafa AR, Mezaros I. Interrelationship between the total protein content of bovine seminal plasma and behavior of spermatozoa after freezing-and-thawing. *Acta Vet Acad Sci Hung.* 1981;28:403-8.
7. Barker CA, Gandier SCC. Pregnancy in a mare resulting from frozen epididymal spermatozoa. *Can J Comp Med.* 1957;21:47-51.
8. Tiplady CA, Morris LHA, Allen WR. Stallion epididymal spermatozoa: pre-freeze and post-thaw motility and viability after three treatments. *Theriogenology.* 2002;58:225-8.
9. James AN, Green H, Hoffman S, Landry AM, Paccamonti D, Godke RA. Preservation of equine sperm stored in the epididymis at 4 °C for 24, 48, 72 and 96 hours. *Theriogenology.* 2002;58:401-4.
10. Morris L, Tiplady C, Allen WR. The in vivo fertility of cauda epididymal spermatozoa in the horse. *Theriogenology.* 2002;58:643-6.
11. Herrera C, Miragaya HM, Conde P, Hynes V, Losinno L, Quintans C, et al. Intracytoplasmic injection of in vitro-matured equine oocytes with frozen-thawed epididymal sperm. *Anim Reprod Sci.* 2006;94:299-302.
12. Cary JA, Madill S, Farnsworth K, Hayna JT, Duoos L, Fahning ML. A comparison of electroejaculation and epididymal sperm collection techniques in stallions. *Can Vet J.* 2004;45:35-41.
13. Bruemmer JE. Collection and freezing of epididymal stallion sperm. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 2006;22:677-82.
14. Melo CM, Papa FO, Fioratti EG, Villaverde AISB, Avanzi BR, Monteiro GA, et al. Comparison of three different extenders for freezing epididymal stallion sperm. *Anim Reprod Sci.* 2008;107:331.
15. Guasti PN, Monteiro GA, Dellaqua Junior JA, Melo CM, Mazieiro RRD, Martin JC, et al. Viability of equine frozen epididymal sperm treated with Pentoxifylline. In: *Proceedings of the 11th Congress of World Equine Veterinary Association; 2009, Guarujá. Guarujá: WEVA; 2009. p.323.*
16. Monteiro GA, Guasti PN, Melo CM, Dellaqua Junior JA, Martin JC, Carneiro R, et al. Comparison between cooled sperm from ejaculate and epididymal cauda. In: *Proceedings of the 11th Congress of World Equine Veterinary Association; 2009, Guarujá. Guarujá: WEVA; 2009. p.296.*
17. Moore I, Squires EL, Graham JK. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. *Theriogenology.* 2005;63:2372-81.
18. Pasquini DF, Melo CM, Papa FO, Fioratti EG, Landim-Alvarenga FC, Alvarenga MA, et al. Effects of seminal plasma and sperm motility factors on viability of epididymal sperm of stallions. *Anim Reprod Sci.* 2008;107:338-9.



19. Heise A, Ahn WK, Volkmann DH, Thompson PN, Gerber D. Influence of seminal plasma on fertility of fresh and frozen-thawed stallion epididymal spermatozoa. *Anim Reprod Sci.* 2010;118:48-53.
20. Monteiro GA, Guasti PN, Melo CM, Dellaqua Junior JA, Papa FO. Comparison between viability of sperm obtained with artificial insemination and recovered from epididymal cauda of subfertile stallions. In: *Proceedings of the 11th Congress of World Equine Veterinary Association*; 2009. Guarujá. Guarujá: WEVA; 2009. p.298.
21. Garde J, Aguado M, Perez S, Garrido D, Perez-Guzman M, Montoro V. Physiological characteristics of epididymal spermatozoa from postmortem rams. *Theriogenology.* 1994;41:2003.
22. Harrison RAP, Vickers SE. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J Reprod Fertil.* 1990;88:343-52.
23. Papa FO, Alvarenga MA, Carvalho IM, Bicudo SD, Ramires PRN, Lopes MD. Coloração espermática segundo karras modificado pelo emprego do barbatimão (*Stryphnodendrum barbatiman*). *Arq Bras Med Vet Zootec.* 1988;40:115-23.
24. Granemann LC. Avaliação comparativa do sêmen equino colhido com vagina artificial e por lavado intraluminal da cauda do epidídimo pós-orquiectomia [dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2006.
25. Muradás PR, Weiss RR, Kozicki LE, Granemann LC, Santos IW, Pimpão CT. Alguns parâmetros de viabilidade de espermatozoides equinos colhidos por vagina artificial e por lavagem da cauda do epidídimo. *Arch Vet Sci.* 2006;11:69-74.
26. Silva AEDF, Dias AL, Unanian MM, Freitas AR, Blach CJ. Conteúdo de peptídeos e avaliação morfofisiológica dos espermatozoides do epidídimo e ejaculado de bovinos. *Rev Bras Zootec.* 2003;32:1890-900.
27. Martins CF, Rumpf R, Pereira DC, Dode MN. Cryopreservation of epididymal bovine spermatozoa from dead animals and its uses in vitro embryo production. *Anim Reprod Sci.* 2007;101:326-31.

**Recebido em: 12/08/10**

**Aceito em: 23/02/11**