

Perspectivas da aplicação comercial de biotecnologias envolvendo espermatozóides obtidos de epidídimo de cães e gatos¹

Perspectives on commercial application of biotechnologies involving spermatozoa of dogs and cats epididymis

Maria Isabel Mello Martins

Departamento de Clínicas Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, CEP 86061-570.
Londrina, PR, Brasil.
Correspondência: imartins@uel.br

Resumo

A biotecnologia da reprodução, seja através da Inseminação Artificial, Transferência de Embriões ou da Criopreservação de Sêmen, é uma ferramenta importante para a manutenção de espécies ameaçadas de extinção, para a redução de estresse e custos de transporte de animais entre zoológicos ou reservas. Os cães e gatos domésticos além de animais de companhia são ótimos modelos experimentais, pela similaridade da fisiologia reprodutiva com as espécies selvagens. A obtenção de espermatozóides da cauda de epidídimo é um recurso utilizado na reprodução assistida, importante na preservação de animais de alto valor genético ou de grande estima que tenham necessidade de serem castrados ou que vêm a óbito. Estudos têm apresentado bons resultados com a obtenção e criopreservação de espermatozóides epididimais morfolologicamente viáveis capazes de ligar-se à zona pelúcida e fertilizar oócitos *in vitro*. Entretanto, pesquisas adicionais devem ser conduzidas com o intuito de avaliar essas células espermáticas quanto à capacidade de fertilização *in vivo*.

Palavras-chave: epidídimo, espermatozóide; cães, gatos; criopreservação.

Abstract

Biotechnology of reproduction techniques such as Artificial Insemination, Embryo Transfer or Semen Cryopreservation are important tools for maintenance of endangered species and reduction of stress and cost of transport of animals between zoos or reserves. Domestic dogs and cats are not only companions but also excellent experimental models due to the similarity of the reproductive physiology with the wild species. Harvesting of spermatozoa from the tail of epididymis, used as a resource in the attended reproduction, is an important technique in the preservation of high genetic value or great esteem that either need to be castrated or die. Some reports have shown encouraging results in the collection and cryopreservation of epididymal spermatozoa morphologically viable and capable to bind to the pellucid zone and therefore fertilize oocytes in vitro. However, further studies are warranted in order to evaluate the in vivo ability of fertilization of these spermatoc cells.

Keywords: epididymis spermatozoa: dogs; cats; cryopreservation.

Os gatos e cães domésticos são considerados animais de companhia, além, de modelo experimental conveniente, podem muitas vezes servir como receptores de embriões, devido ao pequeno número de exemplares de espécies selvagens em zoológicos e reservas (Farstad, 2000).

Para a manutenção de espécies geneticamente estáveis, para a redução do estresse e custos causados pelo transporte de animais para acasalamento entre zoológicos ou reservas, a biotecnologia da reprodução se insere como uma ferramenta importante seja na inseminação artificial, transferência de embrião, ou mesmo na formação de um banco de material genético por meio da criopreservação de germoplasma (Wildt *et al.*, 1992).

A obtenção de sêmen diretamente da cauda do epidídimo e ducto deferente é uma técnica utilizada para os propósitos da reprodução assistida. É um recurso precioso em casos de animais de companhia de alto valor genético ou de grande estima, que precisam ser esterilizados ou que vêm a óbito, já que os espermatozóides obtidos por esta técnica são morfolologicamente viáveis e retêm a capacidade de sofrer a reação de capacitação, ligar-se à zona pelúcida e fertilização (Goodrowe, 1992; Goodrowe e Hay, 1993; Luvoni *et al.*, 2003; Tsutsui *et al.*, 2003).

Pesquisas conduzidas com testículos que foram mantidos em temperatura ambiente por até 5 horas, não detectaram grandes alterações na motilidade espermática (Schäfer e Holzmann, 2000); resultados semelhantes foram obtidos mantendo testículos sob refrigeração a 5°C *overnight* (Goodrowe e Hay, 1993).

¹Palestra apresentada no XVII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 31 de maio a 02 de junho de 2007, Curitiba, PR.

Estudos com cães e ratos demonstraram que após um período de resfriamento de 192 horas (oito dias) a 4°C, espermatozóides móveis foram recuperados do epidídimo ainda com capacidade de se ligarem à zona pelúcida (Sankai *et al.*, 2001; Yu e Leibo, 2002); esses pesquisadores concluíram que espermatozóides recuperados do epidídimo, mesmo alguns dias após a morte do animal, permanecem funcionais. Em 2006, Ponglowhapan *et al.*, concluíram que espermatozóides de epidídimos caninos mantidos a 5°C por quatro dias e posteriormente congelados, não sofreram um dano aparente pós-descongelamento na integridade de acrossoma e motilidade.

Estudos conduzidos para a recuperação de espermatozóides do epidídimo, utilizando a solução de Ringer, sem lactato mostraram que essa solução é eficiente para a recuperação das células espermáticas (Martins *et al.*, 2003, 2004a, Villaverde *et al.*, 2006), a solução fisiológica 0,9% também tem se mostrado eficiente para esse propósito (Martins *et al.*, 2006).

O epidídimo é dividido em cabeça, corpo e cauda e caracteriza-se por apresentar três compartimentos: o lúmen do ducto, contendo os espermatozóides e plasma, o epitélio de revestimento do lúmen e o tecido conectivo, elementos vasculares, musculatura lisa e nervos que formam o tecido extraducto (Varricchio *et al.*, 1996). O epitélio da mucosa epididimal é pseudoestratificado prismático com estereocílios, que são processos imóveis e servem para aumentar a superfície de absorção e/ou secretora do revestimento (Amann, 1995).

Os ductos eferentes e epidídimos têm como funções a remoção de secreções conduzindo os espermatozóides a partir dos túbulos seminíferos, o transporte dos espermatozóides diretamente para o ducto deferente por contrações da musculatura lisa, a maturação dos espermatozóides e a manutenção e armazenamento de espermatozóides férteis em número suficiente para realizar a fecundação (Amann, 1995). O segmento inicial do epidídimo está envolvido com a reabsorção, o segmento do meio com a maturação espermática, e o terminal com o armazenamento de espermatozóides férteis. Dependendo da espécie animal o trânsito espermático pelo epidídimo requer de cinco a quatorze dias (Amann, 1986).

Os espermatozóides sofrem alterações morfo-funcionais importantes de quando passam pelo epidídimo: a migração da gota citoplasmática de uma posição proximal para distal (Crabo *et al.*, 1975), condensação da cromatina (Hingst *et al.*, 1995), início da motilidade e habilidade para reconhecer e se ligar ao oócito (Moore *et al.*, 1983). No processo de maturação estão envolvidas diversas proteínas provenientes do fluido epididimal, que compõem o plasma seminal (Johnston *et al.*, 2001).

Goodrowe e Hay (1993) relataram que espermatozóides recuperados de epidídimos de gatos apresentam motilidade espermática de aproximadamente 50% e porcentagem de células normais de 50%. Constataram também, que espermatozóides provenientes do epidídimo possuem habilidade para capacitação e para os primeiros estágios de fecundação com oócitos de hamster, zona free.

Axnér *et al.* (1998) estudaram diferenças entre a morfologia de espermatozóides provenientes da cauda do epidídimo e do sêmen obtido por eletroejaculação. Relataram que o ejaculado apresentava maior porcentagem de células com anormalidades de cauda e sugeriram que essas alterações eram provocadas pela técnica de colheita. A gota citoplasmática distal foi o defeito mais freqüente em espermatozóides provenientes da cauda do epidídimo e provavelmente está relacionado com o processo de maturação espermática durante sua passagem pelo epidídimo. Supõe-se que o espermatozóide perca este resqúcio citoplasmático durante a ejaculação (Axnér *et al.*, 1998).

O fato das anormalidades espermáticas decrescerem, durante a passagem pelo epidídimo, sugere que células do epitélio epididimário podem reconhecê-los como anormais (Axnér *et al.*, 1999, Johnston *et al.*, 2001). Nos gatos domésticos foi demonstrado um decréscimo na proporção dos espermatozóides com anormalidades de cabeça, acrossoma e de peça intermediária durante o trânsito epididimário, em contraste, foi detectado um pequeno aumento na proporção de espermatozóides com anormalidades de cauda, que pode ter sido causado pela influência osmótica do fluido seminal durante a ejaculação (Tebet *et al.*, 2006).

Em um estudo recente foi evidenciado que a gota citoplasmática e o dobramento de cauda foram as alterações morfológicas mais frequentes encontradas após o processo de centrifugação (600xg/10 minutos) para a separação das soluções isosmóticas, Ringer, sem lactato e a Solução Fisiológica, utilizadas no procedimento de recuperação (Martins *et al.*, 2007, comunicação pessoal).

Estudos realizados em cães demonstraram que não há um decréscimo significativo na integridade das membranas e do acrossoma em espermatozóides provenientes do epidídimo, armazenado por 48 horas a 4°C. Em contraste, foi observado que a motilidade espermática diminuiu significativamente nas primeiras 5 horas de refrigeração, após esse período o decréscimo foi mais lento. Neste estudo, alguns espermatozóides recuperados do epidídimo apresentaram motilidade e capacidade de ligação à zona pelúcida, após um armazenamento por 8 dias a temperatura de 4°C. (Yu e Leibo, 2002).

Foi verificado por Yu *et al.* (2002), que após 6 horas da orquiectomia, a integridade da membrana do espermatozóide a fresco foi de 70 a 80%. Após 48 horas, mais de 70% das células recuperadas do epidídimo refrigerado apresentavam membrana intacta. Resultados da avaliação *in vitro* demonstraram que a concentração de espermatozóides recuperados do epidídimo é semelhante àquelas descritas, para a espécie, no ejaculado (Johnston *et al.*, 2001).

As membranas acrossomais dos felinos parecem ser especialmente sensíveis ao frio (Leibo e Songsasen, 2002). Pope *et al.* (1991) descreveram uma técnica simples e eficiente, utilizada para na análise da integridade do acrossomo, por microscopia de luz, utilizando o corante rosa bengala e *fast green*. Outros métodos também são eficientes, embora sofisticados: microscopia de epifluorescência, utilizando o FITC-PNA (aglutinina de amendoim conjugada à fluoresceína) ou mesmo a microscopia eletrônica de transmissão (Long *et al.*, 1996; Pukazhenthil *et al.*, 1999).

Martins *et al.* (2006) detectaram em amostras de sêmen de origem epididimária descongeladas, uma média 50% de espermatozoides com membrana íntegra, tanto em cães como em gatos, através de sondas fluorescentes

As diferenças morfo-funcionais entre o sêmen do epidídimo e do ejaculado podem influenciar a estabilidade da membrana incluindo a susceptibilidade ao choque térmico e na resistência ao stress osmótico, assim métodos usados para a criopreservação do sêmen ejaculado podem não ser adequados para o epididimário (Hewitt *et al.*, 2001).

Apesar de Rota *et al.* (1995) sugerirem que uma possível vantagem de se usar espermatozoides recuperados diretamente do epidídimo pode ser o fato deles não terem sido expostos ao plasma seminal, que tem se mostrado deletério para a motilidade espermática e fisiologia sob certas condições de armazenamento; recentemente, estudos voltados para várias espécies domésticas têm identificado proteínas presentes no plasma seminal relacionadas à fertilidade (Martins *et al.*, 2004b; Souza, 2003; Martins *et al.*, 2002; Métayer *et al.*, 2002;), entretanto nos gatos, poucos estudos têm sido realizados neste contexto.

Schäfer *et al.* (2000) evidenciaram uma motilidade de 65% para sêmen fresco e 47% após o processo de congelamento de espermatozoides recuperados do epidídimo de gatos. Resultados semelhantes (77,5% *versus* 42,5%) foram obtidos por Martins *et al.* (2006) ao recuperar espermatozoides de epidídimo em soluções isosmóticas.

Apesar da baixa motilidade e vigor espermático da célula epididimária descongelada ter sido relacionada a imaturidade por Santos e Vannucchi (2002), Martins *et al.* (2003) detectaram uma queda significativa da motilidade espermática após a descongelação do sêmen, mas, 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.

A recuperação de espermatozoides de epidídimo de cães e gatos é uma tecnologia perfeitamente aplicável na preservação de germoplasma de animais de valor genético, podendo ser uma ferramenta importantíssima em reprodução assistida. Ainda são necessários muitos estudos relacionados à viabilidade dessas células como a avaliação da capacidade de fertilização de oócitos *in vivo* e *in vitro* e um conhecimento mais detalhado da bioquímica do fluído epididimário.

Referências

- Amann RP.** Reproductive physiology and endocrinology of the dog. In: Morrow DA. *Current therapy in theriogenology*. 2.ed. Philadelphia: WB Saunders, 1986. p.532-538.
- Amann RP.** The vital role of the epididymis. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 11, 1995, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1995. p.213-221.
- Axnér E, Linde-Forsberg C, Einarsson S.** Morphology and motility of spermatozoa from different regions of the epididymal duct in the domestic cat. *Theriogenology*, v.52, p.767-778. 1999.
- 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.
- Crabo BG, Hunter AG.** Sperm maturation and epididymal function. In: Sciarra JJ, Markland C, Speidel J (Ed.), *Control of male fertility*. Hagerstown, PA: Harper & Row, 1975. p.2-23.
- Farstad W.** Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. *Anim Reprod Sci*, v.60/61, p.375-387, 2000.
- Goodrowe KL.** Feline reproduction and artificial breeding technologies. *Anim Reprod Sci*, v.28, p.389-397, 1992.
- Goodrowe KL, Hay M.** Characteristics and zona binding ability of fresh and cooled domestic cat epididymal spermatozoa. *Theriogenology*, v.40, p.967-975, 1993.
- Hewitt DA, Leahy R, Sheldon IM, England GCW.** Cryopreservation of epididymal dog sperm. *Anim Reprod Sci*, v.67, p.101-111, 2001.
- Hingst O, Blottner S, Franz C.** Chromatin condensation in cat spermatozoa during epididymal transit as studied by aniline blue staining and acridine orange staining. *Andrologia*, v.27, p.275-279, 1995.
- Johnston SD, Kustritz MVR, Oslon PNS.** Semen collection, evaluation and preservation. In: Johnston SD, Kustritz MVR, Oslon PNS. *Canine and feline theriogenology*. Philadelphia: WB Saunders, 2001. p.287-306.

- Leibo SP, Songsasen N.** Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species. *Theriogenology*, v.57, p.303-326, 2002.
- Long JA, Wildt DE, Wolfe BA, Critser JK, Derossi RV, Howard JG.** Sperm capacitation and acrossome reaction are compromised in teratospermic domestic cats. *Biol Reprod*, v.54, p.638-646, 1996.
- Luvoni GC, Kalchschmidt E, Leoni S, Ruggiero C.** Conservation of feline semen – part I: cooling and freezing protocols. *J Feline Med Surg*, v.5, p.203-208, 2003.
- Martins MIM, Justino RC, Pereira FD, Perches CS, Chirinéa VH, Lopes MD.** The effect of two solutions in the morphological characteristics and in the freezing of spermatozoa obtained from epidymis of dogs and cats: preliminary results.. *Anim Reprod*, v.3, p.265, 2006. Resumo.
- Martins MIM, Souza FF, Chirinéa VH, Lopes MD.** Functional and structural analysis of canine spermatozoa obtained from the epididymis and submitted to cryopreservation. In: International Symposium on Canine and Feline Reproduction, 5, 2004, São Paulo, Brasil. *Abstract Books...* São Paulo, The Symposium, 2004a, p. 222-224.
- Martins MIM, Souza FF, Chirinéa VH, Tebet J, Lopes MD.** Viabilidade de espermatozóides criopreservados, obtidos do epidídimo de cães. In: Mostra Científica da FMVZ/UNESP, 7, 2003, Botucatu-SP. *Anais ... Botucatu: FMVZ/UNESP*, 2003. p.121. Resumo.
- Martins MIM, Souza FF, Lopes MD.** Caracterization of feline epididymal proteins by SDS-PAGE. In: International Symposium on Canine and Feline Reproduction, 5, 2004, São Paulo, Brasil. *Abstract Books...* São Paulo, The Symposium, 2004b, p. 224-225.
- Martins MIM, Souza FF, Lopes MD.** Eletroforese das proteínas do fluido epididimal canino: Dados preliminares. *Rev Bras Reprod Anim*, v.26, p.72-75, 2002.
- Métayer S, Dacheux F, Dacheux JL.** Comparison, characterization, and identification of proteases and protease inhibitors in epididymal fluids of domestic mammals, matrix metalloproteinases are major fluid gelatinases. *Biol Reprod*, v.66, p.1219-1229, 2002.
- Moore HDM, Hartman TD, Pryor JP.** Development of the oocyte penetrating capacity of spermatozoa in the human epididymis. *Int J Androl*, v.6, p.310-318, 1983.
- Ponglowhapan S, Chatdarong K, Sirivaidyapong S, Lohachit C.** Freezing of epididymal spermatozoa from dogs after cool storage for 2 or 4 days. *Theriogenology*, v.66, p.1633-1636, 2006.
- Pope CE, Zhang YZ, Dresser BL.** A simple staining method for evaluating acrossomal status of cat spermatozoa. *J Zoo Wildl Med*, v.22, p.87-95, 1991.
- Pukazhenthil BS, Pelican K, Wildt DE, Howard JG.** Sensitivity of domestic cat (*Felis catus*) sperm from normospermic versus teratospermic donors to cold-induced acrossomal damage. *Biol Reprod*, v.61, p.135-41, 1999.
- Rota A, Ström B, Linde-Forsberg C.** Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C. *Theriogenology*, v.44, p.885-900, 1995.
- Sankai, T.; Tsuchiya, N.; Ogonuki, N.** Short-term nonfrozen storage of mouse epididymal spermatozoa. *Theriogenology*, v.55, p.1759-1768, 2001.
- Santos SEC, Vannucchi CI.** Criopreservação de espermatozóides epididimários em cães *pós-mortem*. *Rev Bras Reprod Anim*, v.26, p.129-276, 2002.
- Schäfer S, Holzmann A.** The use of transmigration and Spermactm stain to evaluate epididymal cat spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, v.59, p.201-11, 2000.
- Souza FF.** Caracterização eletroforética do perfil protéico e análise bioquímica do plasma seminal canino. 2003. 98f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.
- Tebet JM, Martins MIM, Chirinéa VH, Souza FF, Campagnol D, Lopes MD.** Cryopreservation effects on domestic cat epididymal versus eletroejaculated spermatozoa. *Theriogenology*, v.66, p.1629-32, 2006.
- Tsutsui T, Wada M, Anzai M, Hori T.** Artificial insemination with frozen epididymal sperm in cats. *J Vet Med Sci*, v.65, p.397-399, 2003.
- Varricchio, E, Langella, M, Maharaian V, Paino G.** Structure and function of mammalian epididymis. *Acta Med Vet*, v.42, p.221-234, 1996.
- Villaverde AI, Martins MIM, Castro VB, Lopes MD.** Morphologic and functional characteristics of chilled semen obtained from domestic feline epididymides (*Felis catus*). *Theriogenology*, v.66, p.1641-1644, 2006.
- Wildt DE.** Genetic resource banks for conserving wildlife species: justification, examples and becoming organized on a global basis. *Anim Reprod Sci*, v.28, p.247-257, 1992.
- Yu I, Leibo SP.** Recovery of motile, membrane-intact spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4°C. *Theriogenology*, v.57, p.1179-1190, 2002.
- Yu I, Songsasen N, Godke RA, Leibo SP.** Differences among dogs in response of their spermatozoa to cryopreservation using various cooling and warming rates. *Cryobiology*, v.44, p.62-78, 2002.