



Aspectos relacionados ao transporte espermático e resposta inflamatória uterina em éguas¹

Related aspects to the spermatoc transport and to the uterine inflammatory response in mares

Sandra Mara da Encarnação Fiala², Eduardo Malschitzky^{3,4}, Maria Inês Mascarenhas Jobim⁴, Ricardo Macedo Gregory^{4,5}, Rodrigo Costa Mattos^{4,5,6}

²Departamento Morfologia – Instituto de Biologia, UFPel, Pelotas-RS.

³Curso de Medicina Veterinária, ULBRA, Canoas-RS.

⁴REPROLAB, Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre-RS.

⁵Pesquisador do CNPq

⁶Correspondência: rcmattos@ufrgs.br

Resumo

O objetivo do presente trabalho foi realizar uma revisão sobre transporte e capacitação espermática e da interação espermatozóide-útero. Após a cobertura, as células espermáticas são transportadas rapidamente até o oviduto, sendo visualizadas na ponta do corno uterino oito minutos após a cobertura. Os primeiros gametas são identificados no oviduto 30 minutos após a inseminação aumentando seu número com o decorrer das horas e alcançando sua maior população em, aproximadamente, 4 horas. A junção útero-tubárica funciona como um reservatório de espermatozóides. Por outro lado, foi observada a presença de células espermáticas, a partir de uma hora após a inseminação, no interior das glândulas endometriais podendo ser estas mais um reservatório espermático. A reação acrossômica é um processo irreversível e é essencial para a fertilização. Este processo envolve a fusão e a formação de uma vesícula da membrana do acrossoma com a membrana plasmática da célula espermática, o que permite a liberação de suas enzimas hidrolíticas. O útero reage rapidamente à presença do sêmen através de um aporte de neutrófilos, que são identificados no útero 30 minutos após a cobertura. Esta resposta objetiva a eliminação do excesso de espermatozóides e daqueles defeituosos ou mortos.

Palavras-chave: égua, transporte espermático, capacitação espermática, inflamação uterina.

Abstract

In this work the sperm transport and capacitation and the interaction spermatozoa/uterus are reviewed. Following mating the spermatozoa cells are promptly transported to the oviducts, been visualized in the top of the uterus horn eight minutes after mating. Gametes are detected in the oviduct as quick as 30 minutes after insemination and their number increase as time passes, reaching the maximum population around 4 hours. The uteru-tubaric junction acts as a reservoir of spermatozoa. Furthermore, the presence of spermatoc cells in the inner parts of the endometrial glands was first detected one hour after insemination, suggesting that this structure also acts as a spermatozoa reservoir. The acrosome reaction is an irreversible process been critical for the fertilization. The whole process involves the fusion, followed by a formation of a vesicular like structure containing the acrosome and plasmatic membranes, allowing the release of the hydrolytic enzymes. The uterus quickly reacts to the presence of spermatozoa through appearance of neutrophils, been detected 30 minutes after mating. This reaction aims to destroy the excess of spermatozoa cells as well as the defected ones.

Keywords: mare, sperm transport, sperm capacitation, uterine inflammation.

Introdução

O agronegócio do cavalo no Brasil, uma atividade importante para a economia do País, tanto econômica como socialmente, é responsável pela geração de aproximadamente 3,2 milhões de empregos, dos quais seiscentos mil diretos, o que representa seis vezes a quantidade gerada pela indústria automotiva (Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil - CNA, 2004).

A espécie equina foi considerada por muito tempo como a de menor fertilidade entre as espécies domésticas, o que foi atribuído à características de seleção e problemas relacionados ao manejo reprodutivo (Ginther, 1992). Apesar da melhora em termos de desempenho reprodutivo, através da aplicação de novas técnicas de manejo, geradas a partir da intensa pesquisa nas últimas décadas, uma atenção especial é necessária, a fim de garantir um bom resultado.

O útero é um órgão central para a reprodução, permitindo e favorecendo o acesso do espermatozóide até o oviduto, sendo capaz de reagir à presença do sêmen e à contaminação causada pela cobertura e garantindo um

ambiente capaz de manter o desenvolvimento do embrião e do feto, durante o longo período de gestação característico da espécie equina (Rossdale, 1997).

O objetivo do presente trabalho foi realizar uma revisão sobre transporte e capacitação espermática e da interação espermatozóide-útero.

Interações do espermatozóide com o trato reprodutivo da fêmea

Transporte espermático

O sêmen é depositado diretamente no útero devido a ejaculação ocorrer em jatos, a características anatômicas da cérvix da égua, que se encontra aberta durante o cio, e a sua completa adaptação ao processo uretral, exposto durante a ereção da glândula (Pickett *et al.*, 1989).

Em equinos de vida livre, a égua pode ser coberta várias vezes durante um mesmo estro, com intervalos curtos de tempo entre as coberturas. Estudos sobre comportamento demonstram haver grande variabilidade nas atitudes e no número de cópulas em uma mesma égua, mas é comum que ocorram entre 5 a 10 coberturas em um mesmo cio, com 3 coberturas ocorrendo num período de 24 horas (Fraser, 1992). Esta característica serviria para garantir um número de espermatozóides suficientes no momento da ovulação, uma vez que o estro da égua é muito variável, podendo durar vários dias (Fraser, 1992; Suarez, 1998). Observações contínuas do comportamento de 2 garanhões e suas éguas, por 42 e 28 dias, demonstraram respectivamente, médias de 6 e 5,7 coberturas por égua a cada cio, cuja duração foi média foi de 4,4 e 4,7 dias. As taxas de parição observadas para as duas manadas foram de 87% e 90% (Steinbjörnsson e Kristjánsson, 1999).

Após a cobertura, os espermatozóides são transportados rapidamente até o oviduto, através das contrações uterinas, que auxiliam também na eliminação do excesso de células (Troedsson, *et al.*, 1998). Oito minutos após a inseminação artificial Katila *et al.* (2000) identificaram espermatozóides marcados radioativamente na ponta do corno uterino. Após 30 minutos da inseminação foram identificados em 67% das éguas a presença de células espermáticas nos ovidutos (Fiala *et al.* (2007a). O número de espermatozóides presentes nas trompas aumenta com o decorrer das horas após a inseminação, alcançando sua maior população em aproximadamente 4 horas (Bader, 1982, Fiala *et al.*, 2007b). O que foi confirmado com a realização de lavagens uterinas 4 horas após a inseminação artificial sem diminuição da fertilidade (Brinsko *et al.*, 1991). A partir deste momento, o transporte espermático aparentemente está completo. Um mecanismo de seleção dos espermatozóides ocorre durante o transporte tendo em vista que a maioria dos gametas com anormalidades morfológicas não atinge a junção útero tubárica, ou não desenvolve interações normais com o epitélio do oviduto (Scott *et al.*, 2000). Um maior percentual de éguas apresentou espermatozóides no oviduto ipsilateral ao folículo dominante (50%), até duas horas após a inseminação, comparado ao observado no contralateral (37%). Entretanto, o número médio de células espermáticas no interior das trompas não diferiu entre o oviduto ipsi e o contralateral ao folículo dominante (Fiala *et al.*, 2007a).

O transporte espermático e a capacitação espermática *in vivo* são interligados, e isto pode ser um ponto crítico para o controle da chegada ao oviduto de células capazes de fertilização (Yanagimachi, 1994). O espermatozóide pode sobreviver vários dias, no trato reprodutivo da égua, antes que ocorra a ovulação (Ginther, 1992). Fertilizações ocorrendo com inseminações realizadas até 6 dias antes da ovulação foram relatadas por Woods *et al.* (1990).

A junção útero-tubárica funciona como um reservatório de espermatozóides (Thomas *et al.*, 1994; Scott *et al.*, 2000). Por outro lado, Fiala *et al.* (2007a) observaram a presença de células espermáticas, a partir de uma hora após a inseminação, no interior das glândulas endometriais, a semelhança do descrito na cadela e na gata. Os autores sugeriram que as glândulas uterinas podem ser mais um reservatório espermático.

Os espermatozóides se aderem, ao atingir a da porção inicial da tuba uterina, a sua superfície, mediados por proteínas espermáticas que se ligam à glicoproteínas do oviduto (Ball *et al.*, 2003). Os espermatozóides ligados às células do oviduto apresentam viabilidade prolongada e mantém o cálcio intracelular em níveis basais, podendo assim, prevenir a capacitação prematura (Dobrinski *et al.*, 1995). Em estudos *in vitro*, Ellington *et al.* (1993) observaram que os espermatozóides se aderem às células do epitélio do oviduto em poucos minutos de incubação, iniciando uma intensa atividade flagelar durante o 3º dia, sendo liberados gradualmente durante o 4º dia de cultura. Estes achados poderiam explicar os resultados de Clément *et al.* (2000), que demonstraram que após a realização de 2 ou 3 inseminações em um mesmo estro, a inseminação realizada entre 2 a 4 dias antes da ovulação resultou em um número maior de embriões coletados (70%) do que aquelas realizadas 0 a 2 dias antes da ovulação. Por outro lado, Woods *et al.* (1990) observaram maiores taxas de prenhez em éguas cobertas nas 72 horas que antecedem a ovulação do que naquelas com intervalo superior.

A ligação do espermatozóide às células do epitélio do oviduto é maior na região do istmo do que na ampola da tuba uterina sendo influenciada pela fase do ciclo estral, alterando a produção de muco, de esteróides endógenos e o conteúdo protéico da secreção do oviduto (Thomas *et al.*, 1994). Nesta secreção, foram identificadas mais de 40 bandas protéicas (Battut *et al.*, 1995), onde os autores observaram variação na expressão

de algumas destas proteínas, devido à fase do ciclo estral, e a fatores individuais, em éguas na mesma fase do ciclo.

Capacitação espermática e reação acrossômica

A capacitação espermática é um processo preparatório para a reação acrossômica, sendo definida como a série de alterações que tornam possível que o espermatozóide apresente reação acrossômica (Amann e Graham, 1993). Uma outra modificação necessária é a alteração do padrão de motilidade espermática, que é chamada de hiper-ativação, ou hiper-motilidade. Durante a passagem pelo epidídimo, o espermatozóide adquire uma cobertura glicoprotéica que é acrescida de outras proteínas do plasma seminal, que são liberadas no momento da ejaculação. Essas proteínas têm a função de manter a integridade da membrana espermática durante sua passagem pelo trato reprodutivo feminino. Três classes principais de proteínas são reconhecidas no plasma seminal do garanhão, sendo responsabilizadas pela modulação da capacitação espermática, reconhecimento de gametas e fusão do espermatozóide com o oócito (Töpfer-Petersen *et al.*, 2005). A capacitação espermática é o processo pelo qual essas proteínas são removidas, permitindo a exposição dos receptores de membrana da célula espermática, além da retirada de componentes que recobrem a cauda do espermatozóide e poderiam impedir a alteração do padrão da motilidade (Noyes, 1953). A desestabilização da membrana plasmática do espermatozóide é também necessária para sua capacidade fertilizante, e ocorre através da ligação do colesterol da membrana com proteínas da tuba uterina e de origem folicular (Ehrenwald *et al.*, 1990).

A reação acrossômica é um processo irreversível e é essencial para a fertilização. Este processo envolve a fusão e a formação de uma vesícula da membrana do acrossoma com a membrana plasmática da célula espermática, o que permite a liberação de suas enzimas hidrolíticas. A reação, no entanto, somente ocorre após a ligação do espermatozóide com a zona pelúcida, em algumas espécies, sendo parcialmente induzida por um componente glicoprotéico da zona pelúcida (Yanagimachi, 1994). Estudos *in vitro* demonstraram que, diferente de outras espécies, nas quais a reação acrossômica ocorre em mais de 80% dos espermatozóides imediatamente após a ligação com a zona pelúcida, na espécie equina apenas uma pequena proporção dos espermatozóides ligados à zona pelúcida (< 20%) apresentam reação uma hora após a ligação (Ellington *et al.*, 1993; Meyers *et al.*, 1996). Essa baixa incidência de reação pode significar que, *in vivo*, componentes fisiológicos adicionais, como por exemplo, a progesterona presente no fluido folicular sejam necessários (Cheng *et al.*, 1998). Estes autores sugeriram um efeito aditivo da progesterona do fluido folicular com proteínas da zona pelúcida na indução da reação acrossômica e demonstraram que a progesterona é o mais importante, senão o único, componente do fluido folicular necessário para este evento na espécie equina. Este efeito, no entanto somente pode ser observado após a exposição dos receptores para progesterona na membrana do espermatozóide, o que ocorre após a capacitação.

Inflamação uterina induzida pelo espermatozóide

O útero reage rapidamente à presença do sêmen através de um aporte de neutrófilos, que são identificados no útero 30 minutos após a cobertura (Kotilainen *et al.*, 1994). Esta resposta objetiva a eliminação do excesso de espermatozóides e daqueles defeituosos ou mortos (Troedsson *et al.*, 1998). Quando as coberturas, ou inseminações artificiais, são realizadas com intervalos inferiores a 36 horas, a fertilidade será beneficiada se os espermatozóides viáveis estiverem protegidos da fagocitose no útero, enquanto a eficiência do mecanismo responsável pela eliminação das células inviáveis é mantido (Troedsson *et al.*, 2005).

Comparando o efeito da inseminação com sêmen congelado e com fresco Kotilainen *et al.* (1994) demonstraram que, quanto maior o número total de espermatozóides da dose inseminante, mais intensa é a resposta leucocitária. Da mesma forma, Fiala *et al.* (2007b) observaram que a quantidade de neutrófilos na luz uterina foi maior nas éguas inseminadas com um bilhão do que naquelas inseminadas com menor número de espermatozóides 2 e 4 horas após a inseminação. Independente da dose utilizada, o número de neutrófilos coletados do útero 24 horas após a inseminação foi menor do que o observado nas coletas realizadas após 4 horas, demonstrando o início da resolução da inflamação, que geralmente está encerrada em 48 horas (Katila, 1995).

Aparentemente, uma reação inflamatória mais intensa favoreceria uma recuperação mais rápida do endométrio. Amostras coletadas 48 horas após a inseminação artificial com 20 bilhões de espermatozóides, através de lavagem uterina com pequeno volume, de éguas resistentes à endometrite, apresentaram menor número de neutrófilos do que aquelas inseminadas com dois bilhões (Nikolakopoulos e Watson, 2000). Não foi observada a presença significativa de bactérias em nenhum dos grupos, levando à conclusão de que uma dose inseminante maior leva a uma maior estimulação dos mecanismos de defesa uterina, tornando a resolução da inflamação, induzida pelo espermatozóide, mais rápida. Da mesma forma, foi observado que 24 horas após a IA, o número de neutrófilos, no estrato compacto de éguas inseminadas com um bilhão de espermatozóides, era



semelhante ao de éguas não inseminadas e menor do que o número observado em éguas inseminadas com 100 e 500 milhões (Fiala *et al.*, 2007b).

Referências

- Aman RP, Graham JK.** Sperm function. In: Mckinnon AO, Voss JL (Ed.). *Equine reproduction*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p.735-736
- Bader H.** An investigation of sperm migration into the oviducts of the mare. *J Reprod Fertil*, v.32, p.59-64, 1982.
- Ball BA, Sabouer K, Labonty E.** Characterization of a sperm protein responsible for sperm reservoir formation in the oviduct of the mare. In: University of California - Davis. *Research preview, 2004-2005*. Davis, CA: UC-Davis, 2003. p.29.
- Battut I, Palmer E, Driancourt MA.** Proteins synthesised and released by equine oviducts: Characterization, variations, and interactions with spermatozoa. *Biol Reprod Mono*, n.1, p.131-140, 1995.
- Brinsko SP, Varner DD, Blanchard TL.** The effect of uterine lavage performed four hours post insemination on pregnancy rate in mares. *Theriogenology*, v.35, p.1111-1119, 1991.
- Cheng FP, Gadella BM, Voorhout WF, Fazeli A, Bevers MM, Colenbrander B.** Progesterone-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa is mediated by a plasma membrane progesterone receptor. *Biol Reprod*, v.59, p.733-742, 1998.
- Clément F, Vincent P, Mahla R, Meriaux J, Palmer E.** Which insemination results in fertilization when several are performed before ovulation? *J Reprod Fétil Suppl*, n.56, p.579-585, 2000.
- Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil (CNA).** *Estudo do complexo do agronegócio cavalo*. Brasília: CNA, 2004. 68p (Coletânea Estudos Gleba; 39).
- Dobrinski I, Smith T, Suarez S.** Membrane contact with oviductal epithelium modulates the intracellular calcium concentration of equine spermatozoa in vitro. *Biol Reprod*, v.56, p.861, 1995.
- Ellington JE, Ignatz GG, Varner DD, Marcucio RS, Ball BA.** *In vitro* interaction between oviduct epithelia and equine sperm. *Arch Androl*, v.31, p.79-86, 1993.
- Ehrenwald E, Foote RH, Parks JE.** Bovine oviductal fluid components and their potential role in sperm cholesterol efflux. *Mol Reprod Dev*, v.25, p.195-204, 1990.
- Fiala SM, Jobim MIM, Gregory RM, Mattos RC.** Sperm transport in the oviduct and uterus after AI in different times. *Pferdeheilkunde*, 2007a. Aceito para publicação.
- Fiala SM, Pimentel CA, Mattos, ALG, Gregory RM, Mattos RC.** Effect of sperm numbers and concentration on sperm transport and uterine inflammatory response in the mare. *Theriogenology*, v.67, p.556-562, 2007b.
- Fraser AF.** *The behavior of the horse*. Weybridge, Oxon: Cabi Publishing, 1992. p.131-139.
- Ginther OJ.** *Reproductive biology of the mare: basics and applied aspects*. 2nd ed. Cross Plains: Equiservices Publishing, 1992. 642p.
- Katila T.** Onset and duration of uterine inflammatory response in mares after insemination with fresh semen. *Biol Reprod Mono*, n.1, p.515-518, 1995.
- Katila T, Sankari S, Mäkelä O.** Transport of spermatozoa in the reproductive tracts of mares. *J Reprod Fertil Suppl*, v.56, p.571-578, 2000.
- Kotilainen T, Huhtinen M, Katila T.** Sperm-induced leucocytosis in the equine uterus. *Theriogenology*, v.41, p.629-636, 1994.
- Meyers SA, Liu IKM, Overstreet JW.** Sperm-zona pellucida binding and zona-induced acrossome reactions in the horse: comparison between fertile and infertile males. *Theriogenology*, v.46, p.1277-1288, 1996.
- Nikolakopoulos E, Watson ED.** Effect of infusion volume and sperm numbers on persistence of uterine inflammation in mares. *Equine Vet J*, v.32, p.164-166, 2000.
- Noyes WR.** The fertilizing capacity of spermatozoa. *West J Surg Obstet Gynecol*, v.61, p.342-349, 1953.
- Pickett BW, Amann RP, Mckinnon A.O, Squires EL, Voss JL.** *Management of the stallion for maximum reproductive efficiency, II*. Fort Collins: Colorado State University, 1989.
- Rossdale PD.** The uterus, an organ of many roles. *Pferdeheilkunde*, v.13, p.427-439, 1997.
- Scott MA, Liu IKM, Overstreet JW, Enders AC.** The structural morphology and epithelium association of spermatozoa at the uterotubal junction: a descriptive study of equine spermatozoa in situ, using scanning electron microscopy. *J Reprod Fertil Suppl*, n.56, p.415-421, 2000.
- Steinbjörnsson B, Kristjánsson H.** Sexual behavior and fertility in Icelandhorse herds. *Pferdeheilkunde*, v.15, p.481-490, 1999.
- Suarez SS.** The oviductal sperm reservoir in mammals: mechanisms of formation. *Biol Reprod*, v.58, p.1105-1107, 1998.
- Thomas PG, Ball BA, Brinsko SP.** Interaction of equine spermatozoa with oviductal epithelial cell explant is affected by estrous cycle and anatomic origin of explants. *Biol Reprod*, v.51, p.222-228, 1994.



Töpfer-Petersen E, Ekhlasi-Hundrieser M, Kirchoff C, Leeb T, Sieme H. The role of stallion seminal proteins in fertilization. *Anim Reprod Sci*, v.89, p.159-170, 2005.

Troedsson MHT, Liu IKM, Crabo BG. Sperm transport and survival in the mare: a review. *Theriogenology*, v.50, p.807-818, 1998.

Troedsson MHT, Desvougues A, Alghamdi AS, Dahms B, Dow CA, Hayna J, Valesco R, Collahan PT, Macpherson ML, Pozor M. Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. *Anim Reprod Sci*, v.89, p. 171-186, 2005.

Woods GL, Bergfelt DR, Ginther OJ. Effect of time of insemination relative to ovulation on pregnancy rate and embryonic-loss rate in mares. *Equine Vet J*, v.22, p.410-415, 1990.

Yanagimachi R. Mammalian fertilization. *In:* Knobil E, Neil JD (Ed.). *The Physiology of reproduction*, 2nd ed. New York: Raven Press, 1994. p.198-317.
