



Biotécnicas reprodutivas com o emprego de espermatozoides epididimários em cães *Canine reproductive biotechniques with the use of epididymal sperm*

D.S.R. Angrimani, C.F. Lúcio, G.A.L. Veiga, F.M. Regazzi, L.C.G. Silva, M. Nichi, C.I. Vannucchi¹

Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia,
Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brasil.

¹Correspondência: cacavann@usp.br

Resumo

A recuperação de espermatozoides caninos viáveis oriundos dos epidídimos é de grande importância para a obtenção do material genético de machos de alto valor zootécnico, ou mesmo de espécies em risco de extinção. Para melhor aproveitamento dos espermatozoides epididimários, faz-se necessário estabelecer as condições ideais de transporte, conservação, técnica para colheita das amostras e a sua perspectiva de utilização. Assim, esta revisão tem como objetivo abordar os principais tópicos para o emprego das biotécnicas reprodutivas com espermatozoides epididimários na espécie canina.

Palavras-chave: cão, epidídimo, espermatozoides.

Abstract

The recovery of viable canine epididymal sperm is important because allows obtain genetic material from males with a high zootecnic value or endangered species. For the adequate utilization of the epididymal sperm is necessary to establish the ideal protocol of transportation, storage, the technique of sample recovery, as well as the perspective for it's use. Hence, this review aims to approach the main topics for the employment of reproductive biotechniques with epididymal sperm in dogs.

Keywords: dog, epididymis, sperm.

Introdução

Nos últimos anos, diversas pesquisas foram realizadas com o intuito de compreender a fisiologia reprodutiva dos cães, as quais se tornaram a base para o desenvolvimento de biotécnicas reprodutivas aplicadas (Farstad, 2000). Tais estudos têm como meta aperfeiçoar a reprodução de animais de alto valor zootécnico, entretanto ressalta-se que o cão é o modelo biológico de canídeos selvagens e, particularmente, no estudo da reprodução humana, substituindo essas espécies em metodologias experimentais (Kirchhoff, 2002; Wanke, 2006). Assim, a recuperação de espermatozoides viáveis oriundos diretamente do epidídimo é uma das técnicas em desenvolvimento, visando obter reservas genéticas de animais que vieram a óbito; portadores de afecções com impotência *coeundi* ou mesmo para o uso deste material como modelo experimental, já que os espermatozoides epididimários são morfológicamente viáveis e possuem capacidade fecundante (Tsutsui et al., 2003; Klinc et al., 2005; Thomassen e Farstad, 2009).

As atuais pesquisas na área têm como enfoque o armazenamento e o transporte dos testículos e epidídimos para seu eventual processamento (Mota Filho e Silva, 2011). Objetiva-se padronizar protocolos e técnicas que aperfeiçoem a colheita dos espermatozoides epididimários, permitindo que as amostras possuam qualidade plena para o uso em biotécnicas reprodutivas. Assim, devido à ampla abordagem desse tema, a presente revisão tem como objetivo explicar os principais tópicos da técnica de recuperação de espermatozoides epididimários na espécie canina.

Espermatozoides epididimários

A produção espermática nos mamíferos inicia-se no testículo e a maturação final dos espermatozoides ocorre no epidídimo, órgão que conecta o ducto eferente ao ducto deferente, sendo anatomicamente dividido em: cabeça, corpo e cauda (Varricchio et al., 1996). Entre suas funções, destaca-se: maturação e armazenamento espermático e eliminação de possíveis espermatozoides imperfeitos (Muradás et al., 2006; Oliva et al., 2009). Durante o percurso no epidídimo, os espermatozoides passam por diversas alterações morfofuncionais, tais como: migração da gota citoplasmática da região proximal para a distal, início do ganho da motilidade progressiva e habilidade de reconhecimento e ligação ao oócito (Jervis et al., 2001). Tais processos correspondem à maturação espermática e são mediados por proteínas provenientes de secreções do epitélio seminífero, componentes do fluido epididimário (Johnston et al., 2001; Schimming et al., 2001).

A cauda do epidídimo é o local mais importante para remoção de espermatozoides anormais durante toda a passagem pelo epidídimo, em razão da maior taxa de fagocitose e dissolução celular. Tal processo é claramente seletivo, e as células defeituosas mais suscetíveis são os espermatozoides com cabeça piriforme, estreita na base, pequena, anormal ou subdesenvolvida (Ramamohana Rao et al., 1980). É também a cauda do epidídimo o local no qual os espermatozoides permanecem estocados. Em equinos, sabe-se que, após serem ejaculados, os espermatozoides podem sobreviver por volta de 24 horas. Porém, os mantidos na cauda do epidídimo *in vivo* permanecem viáveis por mais de 15 dias. Tal funcionalidade pode ser justificada pelo reduzido metabolismo das células espermáticas, o que evita sua ativação prematura (Muradás et al., 2006).

Por que utilizar espermatozoides do epidídimo?

A recuperação de espermatozoides provenientes da cauda do epidídimo e do ducto deferente é um procedimento que potencializa o uso de material genético, ao serem empregados para biotécnicas de reprodução assistida em cães (Martins, 2007). O recurso de colheita é vantajoso, pois os espermatozoides podem ser obtidos após o óbito do animal e destinados a protocolos de inseminação artificial a fresco ou congelamento das amostras para posterior utilização, servindo de alternativa para animais de alto valor zootécnico (Thomassen e Farstad, 2009).

A técnica também pode ser empregada em animais inaptos à reprodução, portadores de afecções que comprometam seu sucesso reprodutivo. Por exemplo, Klinc et al. (2005) empregaram a técnica de recuperação de espermatozoides dos epidídimos em um cão com seis anos de idade acometido por hiperplasia prostática benigna. Após o procedimento cirúrgico de orquiectomia, os espermatozoides provenientes da cauda dos epidídimos foram coletados e procedeu-se à inseminação artificial em uma cadela com o material a fresco, resultando em ninhada de oito filhotes.

Diversos animais selvagens estão ameaçados de extinção, entre estes os canídeos, tais como o lobo cinzento (*Canis lupus*) e o lobo-vermelho (*Canis rufus*; Farstad, 2000). No Brasil, podem ser destacados, entre os canídeos ameaçados, o lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) e o cachorro-vinagre (*Speothos venaticus*; Brasil, 2003). Na eventual morte destes animais, a recuperação e a criopreservação dos espermatozoides do epidídimo são de extrema importância para a preservação do material genético (Bainbridge e Jabbour, 1998). Deste modo, devido à semelhança filogenética, o cão é o modelo biológico para estudo e aperfeiçoamento de biotecnologias aplicadas aos canídeos em risco de extinção (Wanke e Gobello, 2006).

Por vezes, o cão é a espécie escolhida para metodologias experimentais envolvendo a espécie humana, pois podem estar sujeitos a afecções semelhantes ao homem, sendo utilizados como modelo para algumas doenças, como, por exemplo, alterações genéticas (Kirchhoff, 2002). Na teriogenologia humana, os cães podem servir às *pesquisas* que envolvem enfermidades do testículo, como a varicocele (Turner, 2001). Em nível epididimário, comprovou-se que o cão é a espécie mamífera com maior semelhança ao homem no tocante à expressão de genes que envolvem os epidídimos (Ivell et al., 1998; Kirchhoff, 2002).

Transporte e conservação dos epidídimos

Em algumas situações, o momento ou o local da castração não são adequados para a manipulação e a preservação dos espermatozoides do epidídimo (Melo et al., 2009). Assim, faz-se necessário o estudo da conservação desse material, a fim de otimizar o intervalo entre a obtenção dos epidídimos, o transporte, a conservação e o processamento das amostras (Hori et al., 2005). A utilização de amostras provenientes do epidídimo após a refrigeração já foi descrita em diversas espécies, entre elas: bovinos (Nichi et al., 2007), equinos (Cary et al., 2004), suínos (Ikeda et al., 2002), cervídeos (Hishinuma et al., 2003), ovinos (Kaabi et al., 2003) e felinos (Gañán et al., 2009). Em cães, Hewitt et al. (2001) demonstraram que a conservação dos epidídimos em temperatura ambiente e a recuperação dos espermatozoides duas horas pós-orquiectomia apresentaram características aceitáveis para a criopreservação, e as amostras permaneceram funcionalmente competentes após a descongelamento.

Com o objetivo de se comparar o método de conservação dos epidídimos caninos em temperatura ambiente (20°C) e sob refrigeração (4°C), amostras foram analisadas quanto à motilidade, morfologia e viabilidade espermática nos períodos de seis, 12 e 24 horas (Hori et al., 2009). Os resultados demonstraram não haver diferença estatística quanto à morfologia e à viabilidade entre os grupos analisados, porém, ao se observar a motilidade, constatou-se queda progressiva ao longo do tempo para os epidídimos mantidos a 20°C, diferentemente das amostras mantidas a 4°C (Hori et al., 2009).

Em um estudo em que analisaram a qualidade espermática por tempo prolongado, a fim de aperfeiçoarem a conservação das amostras, Hori et al. (2005) conservaram epidídimos de cães na temperatura de 4°C por até 48 horas. As amostras foram avaliadas quanto à integridade acrossomal, motilidade e viabilidade espermática e observou-se que os espermatozoides epididimários não sofreram alterações em até 48 horas de refrigeração. Ainda, foi realizada a inseminação artificial intrauterina com o material coletado após congelamento, obtendo-se taxa de prenhez de 80%. Em estudo semelhante, Tittarelli et al. (2006) conservaram epidídimos de cães por um período de até 72 horas na temperatura de 4°C, e não observaram alterações na integridade das

membranas plasmática e acrossomal. Contudo, obtiveram queda progressiva de motilidade espermática ao longo do período de conservação (zero, 24, 48 e 72 horas).

Yu e Leibo (2002), com o intuito de prolongar ainda mais o tempo de conservação dos epidídimos, mantiveram os epidídimos caninos por até oito dias em temperatura de 4°C e observaram decréscimo da motilidade espermática. Contudo, mesmo após o longo período, foi possível observar células com motilidade espermática, com membrana plasmática intacta e com capacidade de ligação à zona pelúcida.

Técnicas de recuperação dos espermatozoides epididimários

Há diversas técnicas descritas em literatura que descrevem a colheita dos espermatozoides da cauda do epidídimo de distintas espécies animais. No caso de cães, devido ao tamanho do epidídimo, os métodos de escolha podem ser: flutuação, fatiamento, lavagem e aspiração.

A técnica de lavagem foi descrita por Marks et al. (1994), os quais, com o auxílio de seringa e agulha, realizaram a lavagem dos epidídimos caninos com solução salina, tendo como acesso à cauda do epidídimo o ducto deferente. Segundo os referidos autores, trata-se do melhor método de recuperação de espermatozoides epididimários, pois um maior número de células espermáticas é obtido quando comparado à aspiração direta dos espermatozoides, que consiste em coletar o material também com o auxílio de seringa e agulha diretamente da cauda do epidídimo (Bartels et al., 1999).

Em pequenos animais, a técnica de flutuação é um dos métodos de preferência, pois consiste em fatiar a cauda do epidídimo e a imergir em um meio gelatinoso, como, por exemplo, o meio de capacitação canino (Kawakami et al., 1993). Em condições ideais (37°C, 5% CO₂, 95% O₂, por 10 min), os espermatozoides irão migrar para o meio e, em seguida, são recuperados por filtração (Yu e Leibo, 2002).

Ainda, há a técnica de recuperação de espermatozoides do epidídimo por fatiamento, que consiste na realização de diversos cortes na cauda do epidídimo. Sequencialmente, pressiona-se a cauda do epidídimo com o objetivo de eliminar os espermatozoides e, então, as amostras devem ser coletadas utilizando-se pipeta automática (Kaabi et al., 2003). Vale ressaltar que, previamente à técnica de fatiamento e flutuação, devem-se retirar por dissecação os vasos sanguíneos presentes na cauda do epidídimo para evitar a contaminação das amostras com sangue (Hori et al., 2011).

Novas perspectivas

Os espermatozoides epididimários, em condições controladas de reprodução assistida, podem gerar resultados semelhantes aos comparados ao sêmen ejaculado, tendo sua utilização como alternativa para as biotecnologias da reprodução em cães (Yu e Leibo, 2002), tais como a inseminação artificial a fresco (Klinc et al., 2005) ou a criopreservação (Hori et al., 2004). Nos últimos anos, a inseminação artificial com sêmen congelado evoluiu satisfatoriamente na espécie canina. Em trabalho realizado por Thomassen e Farstad (2006), são apresentados dados dos últimos 10 anos de inseminação artificial intrauterina não cirúrgica em 665 cadelas, utilizando-se sêmen congelado, em que se obteve taxa de prenhez de 75%. Assim, a utilização de biotecnologias apresenta grande importância na disseminação e preservação do material genético de canídeos, possibilitando a distribuição em escala mundial do sêmen de reprodutores de alto valor zootécnico. Ainda, a criopreservação seminal possibilita o armazenamento do material genético *post mortem*, por meio da colheita de espermatozoides epididimários (Melo et al., 2009).

Pesquisas desenvolvidas com o objetivo de estabelecer protocolos e técnicas de recuperação, transporte e armazenamento de amostras do epidídimo em cães são importantes para a criação de bancos de germoplasma de canídeos selvagens, contribuindo, deste modo, para a preservação destas espécies (Tittarelli et al., 2006). Entretanto, são necessários estudos de aperfeiçoamento das biotecnologias da reprodução em canídeos, como o estabelecimento de protocolos de maturação e fecundação *in vitro*, colheita e congelamento de embriões, além da injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI; Martins, 2007; Travis et al., 2009).

Conclusão

A colheita de espermatozoides epididimários pode ser a última oportunidade para armazenar o material genético de animais superiores, ou mesmo em extinção. Assim, a manipulação das amostras, com respeito ao período de tempo de transporte e conservação, a escolha e o domínio da técnica adequada para a recuperação são de suma importância para a obtenção de amostras de boa qualidade, que podem ser viáveis para utilização futura com sucesso.

Referências

Bainbridge DRJ, Jabbour HN. Potential of assisted breeding techniques for the conservation of endangered mammalian species in captivity: a review. *Vet Rec*, v.143, p.159-168, 1998.



- Bartels P, Lubbe K, Smith RL, Godke RA.** Morphological changes of caudal epididymal spermatozoa of african buffalo (*syncerus caffer*) after storage at 6°C. *Theriogenology*, v.51, p.279, 1999. Resumo.
- Brasil.** Ministério do Meio Ambiente. Espécies da fauna brasileira ameaçadas de extinção. Instrução normativa nº 3, de 27 de maio de 2003. Diário Oficial da União, n.101, 28 de maio de 2003. Seção 1. p.88-97.
- Cary JA, Madill S, Farnsworth K, Hayana JT, Duoos L, Fahning MLA.** Compararison of electroejaculation and epididymal sperm collection techniques in stallions. *Can Vet J*, v.45, p.35-41, 2004.
- Farstad W.** Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. *Anim Reprod Sci*, v.60/61, p.375-387, 2000.
- Gañán NM, Gomendio M, Roldan ERS.** Effect of storage of domestic cat (*felis catus*) epididymides at 5°C on sperm quality and cryopreservation. *Theriogenology*, v.72, p.1268-1277, 2009.
- Hewitt DA, Leahy R, Sheldon IM, England GCW.** Cryopreservation of epididymal dog sperm. *Anim Reprod Sci*, v.67, p.101-111, 2001.
- Hishinuma M, Suzuki K, Sekine J.** Recovery and cryopreservation of sika deer (*cervus nippon*) spermatozoa from epididymides stored at 4°C. *Theriogenology*, v.59, p.813-820, 2003.
- Hori T, Hagiuda K, Endo S, Hayama A, Kawakami E, Tsutsui T.** Unilateral intrauterine insemination with cryopreserved caudal epididymal sperm recovered from refrigerated canine epididymids. *J Vet Med Sci*, v.67, p.1141-1147, 2005.
- Hori T, Matsuda Y, Kobayashi M, Kawakami E, Tsutsui T.** Comparison of fertility on intrauterine insemination between cryopreserved ejaculated and cauda epididymal sperm in dogs. *J Vet Med Sci*, v.73, p.1685-1688, 2011.
- Hori T, Uehara Y, Kawakami E, Tsutsui T.** Artificial insemination of frozen epididymal sperm in beagle dogs. *J Vet Med Sci*, v.66, p.37-41, 2004.
- Hori T, Uehara Y, Kawakami E, Tsutsui T.** Influence of the time between removal and cooling of the canine epididymis on post-thaw caudal epididymal sperm quality. *J Vet Med Sci*, v.71, p.811-815, 2009.
- Ikeda H, Kikuchi K, Nogushi J, Takeda H, Shimada A, Mizokami T, Kanejo H.** Effect of preincubation of cryopreserved porcine epididymal sperm. *Theriogenology*, v.57, p.1309-1318, 2002.
- Ivell R, Pera I, Ellerbrock K, Beiglbock A, Gebhardt K, Osterhoff C, Kirchhoff C.** The dog as a model system to study epididymal gene expression. *J Reprod Fertil*, v.53, p.33-45, 1998.
- Jervis KM, Robaire B.** Dynamic changes in gene expression along the rat epididymis. *Biol Reprod*, v.65, p.696-703, 2001.
- 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.
- Kaabi M, PAZ P, Alvarez M, Anel E, Boixo JC, Rouissi H, Herraes P, Anel L.** Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. *Theriogenology*, v.60, p.1249-1259, 2003.
- Kawakami E, Vandervoort CA, Mahi-Brown CA, Overstreet JW.** Induction of acrosome reaction of canine sperm by homologous zona pellucida. *Biol Reprod*, v.48, p.841-845, 1993.
- Kirchhoff C.** The dog as a model to study human epididymal function at a molecular level. *Mol Hum Reprod*, v.8, p.695-701, 2002.
- Klinc P, Majdic G, Sterbenc N, Cebulj-Kadunc N, Butinar J, Kosec M.** Establishment of a pregnancy following intravaginal insemination with epididymal semen from a dog castrated due to benign prostatic hyperplasia. *Reprod Domest Anim*, v.40, p.559-561, 2005.
- Marks SL, Dupuis J, Mickelsen WD, Memon MA, Platz CC Jr.** Conception by use of postmortem epididymal semen extraction in a dog. *J Am Vet Med Assoc*, v.15, p.1639-1640, 1994.
- Martins MIM.** Perspectivas da aplicação comercial de biotecnologias envolvendo espermatozoides obtidos de epidídimo de cães e gatos. *Rev Bras Reprod Anim*, v.31, p.115-118, 2007.
- Melo CM, Papa FO, Alvarenga MA.** Colheita de sêmen do epidídimo: uma última opção para o seu ganhão. *Braz J Equine Med*, v.23, p.5-6, 2009.
- Mota Filho AC, Silva LDM.** Recuperação e conservação de espermatozoides epididimários. *Embrião*, v.49, p.24-31, 2011.
- 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*, v.11, p.69-74, 2006.
- Nichi M, Goovaerts IGF, Cortada CNM, Barnabe VH, Clercq JBP, Bols PEJ.** Roles of lipid peroxidation and cytoplasmic droplets on in vitro fertilization capacity of sperm collected from bovine epididymides stored at 4 and 34°C. *Theriogenology*, v.67, p.334-340, 2007.
- Oliva SU, Rinaldo PA, Stumpp T.** Biologia epididimária: maturação espermática e expressão gênica. *Mundo da Saúde*, v.33, p.419-425. 2009.
- Ramamohana Rao A, Bane A, Gustafsson BK.** Changes in the morphology of spermatozoa during their passage through the genital tract in dairy bulls with normal and impaired spermatogenesis. *Theriogenology*, v.14, p.1-12, 1980.



Schimming BC, Vicentini CA, Orsi AM. Estudio al microscopio electrónico de barrido del epidídimo en el perro (*canis familiaris*, l.). Rev Chil Anat, v.19, n.2, 2001.

Thomassen R, Farstad W. Artificial insemination in canids: a useful tool in breeding and conservation. Theriogenology, v. 71, p. 190-199, 2009.

Tittarelli C, Savignone CA, Arnaudín E, Stornelli MC, Stornelli MA, Sota RL. Effect of storage media and storage time on survival of spermatozoa recovered from canine and feline epididymides. Theriogenology, v.66, p.1637-1640, 2006.

Travis A.J, Kim Y, Meyers-Wallen V. Development of new stem cell-based technologies for carnivore reproduction research. Reprod Domest Anim, v.44, p.22-28, 2009.

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.

Turner TT. The study of varicocele through the use of animal models. Hum Reprod Update, v.7, p.78-84, 2001.

Varricchio E, Langella M, Maharian V, Paino G. Structure and function of mammalian epididymis. Acta Med Vet, v.42, p.221-234, 1996.

Wanke MM, Gobello C. Reproduccion en caninos y felinos doemesticos. 2.ed. Buenos Aires: Inter-Medica, 2006.

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.
