

MATURAÇÃO ESPERMÁTICA DURANTE O TRÂNSITO EPIDIDIMÁRIO EM UM GARANHÃO

Rogério Oliveira PINHO¹, João Gabriel da Silva NEVES², José Carlos MONTES^{3*},

Bruna Waddington de FREITAS³, Leonardo Franco MARTINS⁴, Erick Fonseca de

CASTILHO³, Breno Soares CAMILO³, José Domingos GUIMARÃES³

Resumo:

Objetivou-se com esse trabalho avaliar *in vitro* a capacidade fecundante de espermatozoides obtidos nas diferentes porções dos epidídimos de um garanhão, por meio das avaliações físicas e morfológicas do sêmen e de testes complementares dos mesmos. Foi constatada a presença de espermatozoides viáveis e com membrana espermática íntegra ao longo do epidídimo, porém, apenas aqueles obtidos da cauda do epidídimo apresentaram motilidade total significativa e com potencial fecundante. Verificou-se que os valores baixos de células reativas e altos valores para células lesadas e valores de anomalias de cauda (CFD e DG), indicaram baixa integridade funcional de membrana plasmática.

Palavras-chave: garanhão, sêmen, trânsito epididimário

Summary:

The aim of this study was to assess the *in vitro* fertilization capacity of equine epididymal spermatozoa, by morphological assessment of semen and complementary tests. The presence of live spermatozoa and with intact spermatid membranes through the entire epididymis were found, but only those found in the epididymis cauda showed significantly total motility and with fertilizing potential. It was observed that low values of reactive cells, high values of injured cells and defects in cauda cells, indicated low plasmatic membrane functional integrity.

Keywords: epididymal traffic, semen, stallion

¹Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil; ²Médico Veterinário Autônomo; ³Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil; ⁴Departamento de Veterinária, Universidade Paranaense, Umuarama, PR, Brasil; *Autor correspondente: e-mail: zecave@live.com

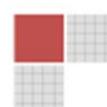
Introdução

O epidídimo é anatomicamente conectado ao testículo e pode ser dividido em cabeça, corpo e cauda. Cada região secreta substâncias específicas que promovem mudanças na composição química e protéica do fluido epididimário, essenciais para a manutenção da viabilidade da célula espermática (Dacheux *et al.*, 2003).

Baseando-se na estrutura celular, o epidídimo dos garanhões pode ser dividido de seis a oito partes, sendo que cada uma possui uma função diferente (Amann, 1992) e o comprimento do ducto epididimário pode chegar em equinos a 80 metros (Oliva *et al.*, 2009). Serre *et al.* (1998) destaca que a regionalização epididimária correlaciona as características morfológicas com as propriedades funcionais, sendo a cabeça e corpo epididimário relacionados com a aquisição da habilidade progressiva dos espermatozoides e capacidade fecundante, enquanto que a cauda do epidídimo está associada com o armazenamento espermático e a remoção de células anormais.

O trânsito espermático epididimário contribui na maturação dos espermatozoides mediante interações com diversas proteínas presentes no epidídimo que modificam seu metabolismo e sua estrutura incluindo a aquisição da capacidade fertilizante, caracterização da membrana plasmática e motilidade progressiva (Tiplady *et al.*, 2002; Gatti *et al.*, 2004).

A utilização de espermatozoides provenientes do epidídimo dos animais é uma técnica importante para favorecer a preservação da genética de animais com alto valor zootécnico ou de machos de espécies ameaçadas de extinção (Mota Filho e Silva, 2012). Espermatozoides coletados do epidídimo de garanhões têm apresentado motilidade progressiva igual ou melhor que aqueles provenientes do ejaculado (Tiplady *et al.*,



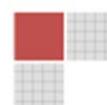
2002), e inclusive até com melhores taxas de concepção quando comparados com espermatozoides do ejaculado (Monteiro *et al.*; 2011).

Estudos sobre a recuperação de espermatozoides do epidídimo demonstraram que estas células mantêm-se viáveis à temperatura ambiente por 24 horas pós-orquiectomia e que o número de espermatozoides obtidos da cauda do epidídimo é maior do que o número de espermatozoides de um ejaculado em vagina artificial (Neild *et al.*, 2006; Monteiro *et al.*, 2013). Além disso, Monteiro *et al.* (2013) sugere que espermatozoides do epidídimo são menos sensíveis ao choque térmico causado pela criopreservação de espermatozoides.

Objetivou-se com esse trabalho avaliar *in vitro* a capacidade fecundante de espermatozoides obtidos nas diferentes porções dos epidídimos de um garanhão, por meio das avaliações físicas e morfológicas do sêmen e de testes complementares dos mesmos.

Material e métodos

Foi utilizado um garanhão sem raça definida de seis anos de idade criado no município de Viçosa – MG. Foram realizadas quatro coletas de sêmen em dias consecutivos utilizando-se vagina artificial modelo Missouri e uma égua em estro natural como manequim. O sêmen obtido foi avaliado quanto a sua motilidade e vigor espermático imediatamente após a coleta. Uma alíquota de sêmen foi acondicionada em um microtubo de plástico contendo 1 mL de formol salina tamponado até que este ficasse turvo para realização da avaliação morfológica dos espermatozoides. Por meio de preparação úmida e sob microscopia de contraste de fase em aumento de 1.000x (sob uma gota de óleo de imersão) foram avaliadas 400 células por ejaculado e mensurado

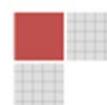


em percentagem de defeitos espermáticos segundo os critérios de classificação preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013).

Posteriormente, o animal foi orquiectomizado e seus epidídimos foram dissecados e separados em quatro porções de acordo com a região epididimária a ser processada (1-porções A, B e C da cabeça do epidídimo; 2, porções D e E do corpo do epidídimo; 3- porção F do corpo do epidídimo; 4- porção G da cauda do epidídimo). As porções foram maceradas e diluídas em meio de congelamento (Martin, 1997) para posterior realização dos testes complementares para verificar a funcionalidade da membrana plasmática por meio dos testes hiposmótico, uso de sondas fluorescentes e coloração supravital.

O teste de integridade de membrana por epifluorescência (Vickers, 1990) foi realizado, colocando-se 100 µL de sêmen, 1 µL de iodeto de propídio (PI) e 1 µL de carboxifluoresceína em um microtubo de 1,5 mL sob abrigo de luz. As amostras foram incubadas a 37 °C por oito minutos. Uma gota foi então depositada entre lâmina e lamínula e analisada em microscopia de fluorescência em aumento de 1.000X com auxílio de óleo de imersão. Foram avaliadas 100 células por amostra, sendo consideradas com membrana íntegra aquelas que coraram em verde e as que corarem em vermelho foram consideradas com membrana danificada.

O teste hiposmótico (Revel e Mrode, 1994) foi realizado retirando-se uma alíquota de 100 µL do produto obtido de cada porção do epidídimo e adicionando-a a 800 µL de água destilada previamente aquecida em banho-maria, dentro de um microtubo de plástico, numa proporção final de 1:9. A amostra foi então incubada por 15 minutos a 37 °C e então adicionada de 0,5 mL de formol salina tamponado e posterior avaliação entre lâmina e lamínula e leitura em aumento de 1.000x com auxílio de óleo de imersão,



sendo contabilizadas 100 células, considerando-se como reativas aquelas células que apresentaram dobramento de cauda. Da porcentagem final registrada, foi subtraído o número de células com dobramento de cauda observado na avaliação morfológica.

Resultados e Discussão

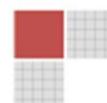
Os resultados das análises física, morfológica e dos testes complementares são descritos nas tabelas 1 e 2:

Tabela 1. Análise física e testes complementares do sêmen de garanhão pré e pós orquiectomia

Coletas	Motilidade (%)	Vigor (0-5)	Supravital (% de vivos)	Hiposmótico (% de reativos)	Epifluorescência (% lesados)
<i>Sêmen in natura</i>					
1*	50,0	3,0	-	-	-
2*	60,0	3,0	-	-	-
3*	70,0	3,5	-	-	-
4*	70,0	3,5	-	-	-
<i>Sêmen epididimário</i>					
1	0,0	0,0	72,5	28,5	96,5
2	10,0	2,0	83,5	40,5	94
3	7,5	2,2	73,0	39,0	62
4	45,0	3,0	73,5	39,5	76

*Coletas de 1 – 4: Coletas pré-orquiectomia com vagina artificial. **Coleta 5: porções epididimárias.

A motilidade espermática foi maior na porção da cauda do epidídimo (porção G) de ambos os lados quando comparadas as diferentes porções do epidídimo. Isso ocorreu provavelmente pela presença da gota protoplasmática que se manteve em maior



proporção nos espermatozoides obtidos do epidídimo (tabela 2), principalmente da cabeça e início da cauda, já que a gota protoplasmática é perdida na maioria dos espermatozoides após o trânsito epididimário, embora England & Pacey (1998) tenham observado que essa diferença tem pouca importância uma vez que as contrações uterinas parecem ter maior importância no processo de fecundação do oócito do que o movimento espermático. No entanto, observou-se maior motilidade espermática para o sêmen do ejaculado quando comparado às regiões epididimárias, provavelmente por ativação da motilidade espermática que possa proporcionar o plasma seminal (Elzanaty *et al.*, 2002). Acott e Carr (1984) destacam que o baixo pH no epidídimo pode ser um fator crítico para diminuir a motilidade dos espermatozoides presentes no epidídimo. A fertilidade dos espermatozoides da cauda do epidídimo pode se tornar comprometida e até ser menor que a dos espermatozoides do ejaculado, devido a variações nas características de superfícies das células e baixa motilidade dos espermatozoides do epidídimo (Goovaerts *et al.*, 2006).

O teste de epifluorescência demonstra maior viabilidade de espermatozoides obtidos das porções finais do epidídimo, corroborando ao descrito por Amann (1992), indicando a importância das interações bioquímicas e metabólicas que acontecem durante o trânsito no epidídimo e que favorecem a aquisição da maturação espermática.

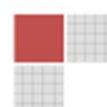


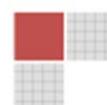
Tabela 2. Porcentagem dos defeitos espermáticos em sêmen in natura ejaculado e de diferentes porções epididimárias de um garanhão

Coletas	ACR (%)	GP (%)	CFD (%)	DG (%)	PI (%)	GD (%)	AB (%)	CIN (%)	DM (%)	Dmen (%)	DT (%)
<i>Sêmen in natura</i>											
1*	3	10	2	3	1	11	6	3	19	23	42
2*	-	5	9	7	2	4	7	6	27	20	47
3*	-	4	6	3	2	1	5	4	17	14	31
4*	-	3	5	7	-	3	4	6	15	17	32
<i>Sêmen epididimario</i>											
1	0,5	30,5	4	2	-	-	7	13,5	39	21,5	60,5
2	2,5	25,5	1,5	2	-	5,5	7,5	8	35,5	21,5	57
3	1,0	7	2,5	2,5	1,5	17,5	9,5	11,5	19,5	39,5	59
4	1,5	4	4	1	1	11	9,5	14	13	36	49

*Coletas de 1 – 4: Coletas pré-orquiectomia com vagina artificial. **Coleta 5: porções epididimárias.

ACR: % de defeitos de acrossoma; GP % de defeitos de gota citoplasmática proximal; CFD: % de defeitos de cauda fortemente dobrada; DG: % de defeitos de cauda dobrada com gota; PI: % de defeitos de peça intermediária; GD: % de defeitos de gota citoplasmática distal; AB: % de defeitos de inserção abaxial de cauda; CIN: % de cabeça isolada normal; DM: % de defeitos maiores; Dmen; % de defeitos menores; DT: % de defeitos totais.

Há maior percentual de espermatozoides com gota protoplasmática proximal nas porções 1 e 2 do epidídimo do que nas demais porções e sêmen ejaculado. Tal resultado era esperado, uma vez que é sabido que o epidídimo participa na estocagem e maturação final dos espermatozoides, demonstrando a importância do trânsito epididimário para que ocorra a perda de gota proximal e distal (Goovaerts *et al.*, 2006). Ressalta-se que as demais anomalias espermáticas não diminuíram, indicando a ineficácia do epidídimo na absorção de células espermáticas defeituosas. Da mesma forma, com relação aos testes complementares, somente o teste de epifluorescência foi eficaz em demonstrar a



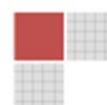
maturação funcional da membrana plasmática dos espermatozoides durante o trânsito epididimário, embora, com valores ainda elevados nas porções 3 e 4.

Conclusões

Quando os testes complementares são avaliados em conjunto, verifica-se que os valores baixos de células reativas e altos valores para células lesadas e valores de anomalias de cauda (CFD e DG), indicam baixa integridade funcional de membrana plasmática e que o animal do presente estudo apresentava um quadro de degeneração epididimária leve.

Referências

- ACOTT, T.S.; CARR, D.W. Inhibition of bovine spermatozoa by caudal epididymal fluid: II. Interaction of pH and a quiescence factor. *Biology of Reproduction*, v.30, p.926-935, 1984.
- AMANN, R.P. Functional anatomy of the adult male. In: MCKINNON, A.O. *Equine Reproduction Chapter 76*, p.1137, 1992.
- CBRA - COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal 3.ed. Belo Horizonte, p.104, 2013.
- 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.
- GATTI, J.L.; CASTELLA, S.; DACHEUX, F.; ECROYD, H.; METAYER, S.; THIMON, V.; DACHEUX, J.L. Post-testicular sperm environment and fertility. *Animal Reproduction Science*, v.82-83, p.321-39, 2004.
- ELZANATY, S.; RICHTHOFF, J.; MALM, J.; GIWERCMAN, A. The impact of epididymal and accessory sex gland function on sperm motility. *Human Reproduction*, v.17, p.2904-11, 2002.
- ENGLAND, G.C.W; PACEY, A.A. Transportation and interaction of dog spermatozoa within the reproductive tract of the bitch: comparative aspects. In: LINDE-



- FORSBERG, C. Advances in canine reproduction Uppsala: SLU Service/Repro; p.57–84, 1998.
- GOOVAERTS, I.G.F.; HOFACK, G.G.; VAN SOOM, A.; DEWULF, J.; NICHI, M.; DE KRUIF, A.; BOLS, P.E. Evaluation of epididymal semen quality using the Hamilton–Thorne analyser indicates variation between the two caudae epididymides of the same bull, *Theriogenology*, v.66, p.323-330, 2006.
- MONTEIRO, G.A.; PAPA, F.O.; ZAHN, F.S.; DELLAQUA, JUNIOR J.A.; MELO, C.M.; MAZIERO, R.R.D.; AVANZI, B.R.; ALVARENGA, M.A.; GUASTI P.N. Cryopreservation and fertility of ejaculated and epididymal stallion sperm. *Animal Reproduction Science*, v.127, p.197-201, 2011.
- MONTEIRO, G.A.; FREITAS-DELL’AQUA, C.P.; GUASTI, P.N.; DELL’AQUA JR., J.A.; ALVARENGA, M.A.; LANDIM, F.C.; PAPA, F.O. Comparison of Apoptotic Cells Between Cryopreserved Ejaculated Sperm and Epididymal Sperm in Stallions. *Journal of Equine Veterinary Science*, v.33, p.552-556, 2013.
- MOTA FILHO, A.C.; SILVA, L.D.M. Recuperação e conservação de espermatozoides epididimários de mamíferos. *Acta Veterinaria Brasilica (UFERSA)*, v.6, p.1-8, 2012.
- NEILD, D.; MIRAGAYA, M.; CHAVES, G.; ALONSO, A.; GAMBAROTTA, M.; LOSINNO, L.; AGÜERO, A. Cryopreservation of cauda epididymis spermatozoa from slaughterhouse testicles 24 h after ground transportation. *Animal Reproduction Science* v.94, p.92–95, 2006.
- OLIVA, S.U.; RINALDO, P.A; STUMPP, T. Biologia epididimária: Maturação espermática e expressão gênica. *O Mundo da Saúde*, v.33, p.419-425, 2009.
- REVEL, S.G. & MRODE, R.A. Na osmotic resistance test for bovine sêmen. *Animal Reproduction Science*, v.36, p.77-86, 1994.
- SERRE, V; ROBAIRE, B. Segment-specific morphological changes in aging Brown Norway rat epididymis. *Biology of Reproduction*, v.58, 497-513, 1998.
- TIPLADY, C.A.; MORRIS, L.H.A.; ALLEN, W.R. Stallion epydidimal spermatozoa; pre-freeze and post-thaw motility and viability after three treatments. *Theriogenology*, v.58, p.225-228, 2002.
- VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.88, p.343-352, 1990.

