

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

LARYSSA LAYS ARAUJO DE OLIVEIRA

**MORFOLOGIA ESPERMÁTICA NAS DIFERENTES PORÇÕES DO TRATO
REPRODUTIVO DE CÃES**

UBERLÂNDIA

2017

LARYSSA LAYS ARAUJO DE OLIVEIRA

**MORFOLOGIA ESPERMÁTICA NAS DIFERENTES PORÇÕES DO TRATO
REPRODUTIVO DE CÃES**

Trabalho de conclusão de curso apresentado como requisito parcial à obtenção do grau de Médico Veterinário, no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia.

Orientadora: Prof. Dra. Teresinha Inês Assumpção

UBERLÂNDIA

2017

RESUMO

A recuperação de espermatozoides do trato reprodutivo de animais mortos ou orquiectomizados é uma técnica interessante para a conservação de material genético. O objetivo do estudo foi caracterizar os aspectos morfológicos de espermatozoides de cães, obtidos dos testículos, cabeça e cauda do epidídimo e ducto deferente. Amostras foram coletadas de dez animais pós orquiectomia. Os testículos receberam um corte transversal no terço médio e lavados com solução de PBS (Dulbecco modificado), o mesmo feito com a cabeça e cauda do epidídimo e os ductos deferentes após serem fatiados. A morfologia espermática foi avaliada utilizando microscopia óptica de contraste de fase (câmara úmida) e lâminas coradas com rosa bengala. Foi realizado também o teste supravital com eosina-nigrosina. A proporção de espermatozoides com anormalidades foi considerada elevada, sendo 47% no testículo, 65% na cabeça do epidídimo, 57% na cauda do epidídimo e 44% no ducto deferente. Os tipos de patologias de maior incidência foram defeitos de gota citoplasmática proximal, cauda fortemente dobrada ou enrolada e cabeças isoladas. O teste supravital evidenciou o aumento de células vivas ao longo do trato reprodutivo com 33% no testículo, 77 na cabeça do epidídimo, 80% na cauda do epidídimo e 79% no ducto deferente. As técnicas utilizadas mostraram-se eficientes para obtenção de espermatozoides epididimários em cães, sendo que os mesmos apresentaram elevado número de alterações morfológicas, porém ficando evidente que epidídimo seleciona e retira do sêmen as células mortas e defeituosas durante a maturação espermática.

PALAVRAS-CHAVE: reprodução, canídeo, maturação espermática.

ABSTRACT

The recovery of spermatozoa from the reproductive tract of dead animals or orchietomized is an interesting technique for the conservation of genetic material. The objective of the study was to characterize the morphological aspects of spermatozoa from dogs obtained from the testicles, head and tail of the epididymis and vas deferens. Samples were collected from ten animals after orchietomy. The testicles were received a cross section in the middle third and washed with PBS solution (Dulbecco modified), the same with the head and tail of the epididymis and the vas deferens after slicing. The spermatid morphology was evaluated using phase contrast optical microscopy (wet chamber) and slides stained with rose bengala. The supravital test with eosin-nigrosin was also performed. The proportion of spermatozoa with abnormalities was considered high, being 47% in the testis, 65% in the head of the epididymis, 57% in the tail of the epididymis and 44% in the vas deferens. The types of pathologies of higher incidence were defects of proximal cytoplasmic droplet, strongly folded or coiled tail, and isolated heads. The supravital test evidenced the increase of living cells along the reproductive tract with 33% in the testis, 77% in the head of the epididymis, 80% in the tail of the epididymis and 79% in the vas deferens. The techniques used were efficient to obtain epididymal spermatozoa in dogs, and they presented a high number of morphological alterations, but it was evident that the epididymis selected and removed from the semen dead and defective cells during sperm maturation.

KEY WORDS: reproduction, canid, sperm maturation.

LISTA DE FIGURA E TABELAS

- Figura 1- Dissecção e preparação dos testículos e epidídimos dos cães. (1)testículo, (2) cabeça/
corpo epidídimo, (3) cauda do epidídimo e (4) ducto deferente.....13
- Tabela 1 – Alterações morfológicas dos espermatozoides de cães verificadas no testículo, cabeça do
epidídimo, cauda do epidídimo e ducto deferente (porcentagem).....14
- Tabela 2 - Espermatozoides avaliados pelo teste supravital no testículo, cabeça e cauda do epidídimo
e ducto deferente de cães (porcentagem).....16

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
2 OBJETIVO	8
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
3.1 Epidídimo	8
3.2 Técnicas de coleta de espermatozoides do epidídimo	8
3.3 Maturação espermática	9
3.4 Classificação dos espermatozoides por tipo de defeito	11
3.5 Técnicas para avaliação morfológica	11
4 MATERIAL E MÉTODOS	12
4.1 Animais	12
4.2 Coleta do sêmen	12
4.3 Análise morfológica do sêmen	13
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
6 CONCLUSÕES	16
REFERÊNCIAS	16

1 INTRODUÇÃO

O sistema reprodutor masculino é formado pelos testículos onde são produzidos os espermatozoides, epidídimos, ductos eferente e deferente e a glândula prostática. Nos cães, os epidídimos estão acoplados a superfície dorsolateral dos testículos, com sua cabeça localizada na borda cranial e a cauda na borda caudal (CBRA, 2013).

A espermatogênese é o processo em que as espermatogônias se dividem para formar os espermatozoides, sendo que após sua formação no ambiente testicular, o espermatozoide necessita passar por um processo de maturação para que ele seja capaz de fertilizar o oócito. A maturação espermática se inicia na cabeça do epidídimo e continua na região do corpo, envolve intensas alterações morfológicas e bioquímicas, garantindo a formação de espermatozoides aptos a reconhecer e fertilizar o oócito no trato reprodutor feminino. Durante essa maturação ao longo do epidídimo os espermatozoides adquirem motilidade progressiva, bem como potencial para sobrevivência e para o sucesso na fertilização (OLIVA et al., 2009).

A remoção de espermatozoides com anormalidades ocorre por fagocitose nas células epiteliais dos ductos eferentes e por macrófagos intra-epiteliais do epidídimo. Já a migração da gota citoplasmática do colo espermático para o final da peça intermediária do flagelo, ocorre durante o trajeto pelo epidídimo, e em algumas espécies a liberação da gota se dá no momento da ejaculação (GATTI et al., 2004, BASKA et al., 2008). Ramomohana Rao et al. (1980) afirmam que a taxa de remoção de células patológicas parece depender principalmente da qualidade dos espermatozoides que saem do testículo.

A recuperação de espermatozoides do epidídimo de animais mortos ou pós orquiectomia é uma técnica extremamente interessante para obter material genético, pois estes gametas são capazes de resistir a diferentes técnicas de criopreservação, podendo ser utilizados na inseminação artificial, produção in vitro de embriões, entre outras, além de ser uma boa fonte de material para estudos morfológicos (MARTINEZ-PASTOR et al., 2006, MOTA FILHO e SILVA, 2012). Esses espermatozoides recuperados poderão ser utilizados na reprodução de espécies ameaçadas, em animais de alto valor zootécnico ou também no homem (THOMASSEN e FARSTAD, 2009). Além disso, o estudo das mudanças ocorridas no espermatozoide durante o trajeto pelo epidídimo permite o desenvolvimento de contraceptivos masculinos e a melhoria de biotécnicas reprodutivas (MA et al., 2013). Assim, antes de se estabelecer técnicas de reprodução assistida nos cães é necessário conhecer as características morfológicas dos espermatozoides nas diversas porções do trato reprodutivo.

2 OBJETIVO

O objetivo desse estudo foi caracterizar os aspectos morfológicos de espermatozoides de cães obtidos dos testículos, cabeça e cauda do epidídimo e ducto deferente.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 EPIDÍDIMO

O epidídimo é um órgão localizado entre os ductos eferentes e os deferentes, composto por cabeça, corpo e cauda. Suas principais funções são transporte, maturação e armazenamentos dos espermatozoides. Poucos espermatozoides são encontrados no segmento inicial, a maior quantidade está localizada na cauda por ser o local de armazenamento (YANAGIMACHI et al., 1985; CORNWALL, 2009).

Os tipos de células presentes no epidídimo são: células principais que são as mais abundantes, células basais, células apicais, células estreitas, células claras e células de halo. Cada tipo de célula pode expressar diferentes proteínas dentro das distintas regiões epididimárias, o que indica que as células realizam diferentes funções de acordo com sua localização e que a especificidade das secreções epididimárias é progressivamente estabelecida com a idade (ROBAIRE et al., 2000, 2006). Sob domínio de andrógenos, o epitélio do epidídimo secreta proteínas dentro do lúmen do órgão e geram um ambiente bem complexo para os espermatozoides (HERMO et al., 1994, 2004; SULLIVAN, 2004), o que prepara os espermatozoides para fertilização e armazenamento até o momento da ejaculação, e também, fornece os padrões essenciais em termos de temperatura, oxigênio, pH e energia (DACHEUX et al., 2005).

De uma forma geral, o plasma epididimário é formado por lipídeos e proteínas secretadas e absorvidas pelos epidídimos (GUYONNET et al., 2011). Existe uma barreira hemato-epididimária que isola o ambiente epididimal do sangue, portanto sua regulação funcional ocorre localmente (FOUCHECOURT et al., 2000). O controle das secreções do epitélio do epidídimo ocorre mediado por hormônios esteroides, principalmente a dihidrotestosterona (LEGARE et al., 1999).

3.2 TÉCNICAS DE COLETA DE ESPERMATOZOIDEOS DO EPIDÍDIMO

O espermatozoide é rotineiramente coletado no sêmen ejaculado para análises e processamentos de criopreservação, porém, se um doador acidentalmente morrer ou sofrer lesão física não

reprodutiva, o espermatozoide ainda pode ser coletado da cauda do epidídimo que é um local de armazenamento do mesmo (HORI et al., 2015).

Para a técnica de coleta do sêmen do epidídimo, este deve ser encaminhado junto com o cordão espermático que deverá ser ligado para evitar extravasamento de sangue e sêmen do ducto deferente. É ideal que a retirada do trato reprodutivo seja realizada antes ou imediatamente após a morte. Os epidídimos podem ser transportados em sistema de refrigeração até o local de processamento das amostras. Assim que os testículos chegam ao laboratório devem ser lavados com solução de fisiológica para retirar os resíduos de sangue. Então, os epidídimos são separados dos testículos, sendo isoladas a cabeça e cauda do epidídimo e o ducto deferente (MELO et al., 2008).

As técnicas para coletar os espermatozoides do epidídimo são: flutuação, fatiamento e fluxo retrógrado. A técnica de flutuação realiza-se cortes da cauda do epidídimo e imersão em diluente de sêmen específico que separa as células espermáticas (CARY et al., 2004). A coleta por lavagem de ductos deferentes ou por fluxo retrógrado da cauda do epidídimo é realizada injetando solução salina diretamente dentro do ducto, sendo o líquido recolhido na extremidade oposta, o que permite a captação de um maior número de espermatozoides (BRUEMMER, 2006). O método de fatiamento permite a coleta de espermatozoides de cães de qualquer tamanho, mas pode ser contaminado com pequenas quantidades de sangue e tecido (FERNÁNDEZ-SANTOS et al., 2009). Uma insignificante diferença foi notada entre os métodos, entre o tempo em que o epidídimo foi removido até a coleta dos espermatozoides e a contagem média de espermatozoides totais, que foi maior no método de lavagem do que no fatiamento, porém a motilidade dos espermatozoides foi a mesma entre os métodos (HORI et al., 2015).

3.3 MATURAÇÃO ESPERMÁTICA

A maturação dos espermatozoides envolve alterações morfológicas e bioquímicas na superfície deste em resposta às secreções epididimárias de enzimas, proteínas e glicoproteínas, que são essenciais no processo de fertilização (ROBAIRE et al., 2000 e 2006). O conhecimento das interações entre o microambiente do líquido luminal e a dinâmica do epitélio do epidídimo é indispensável para a compreensão do processo de desenvolvimento e amadurecimento dos espermatozoides no epidídimo (ARROTÉIA et al., 2012).

A presença de lipídeos no fluido epididimário é fundamental para maturação dos espermatozoides pois estes lipídeos contribuem para mudanças na membrana plasmática das células espermáticas durante a maturação e garantem a proteção dessas células durante suas modificações

estruturais (POULOS e WHITE, 1973). No processo de maturação do espermatozoide as moléculas são segregadas no líquido luminal por diferentes regiões do epidídimo. Essas moléculas interagem sequencialmente com a superfície dos espermatozoides ou o acrossoma e alteram sua função molecular (ROBAIRE et al., 2000, 2006; GATTI et al., 2004; DACHEUX et al., 2005; SULLIVAN et al., 2005).

Dentre as modificações morfofuncionais que ocorrem nos espermatozoides durante a maturação podemos citar a migração da gota citoplasmática, que é um resíduo que permanece no espermatozoide após a liberação pelas células de Sertoli durante a espermatogênese e durante o transito pelo epidídimo ela se migra ao longo dos espermatozoides (COOPER, 2011). Outra modificação é a alteração acrossomal que exerce influência direta sobre a fecundação oocitária (LAKOSKI et al., 1988). Ocorre ainda a remoção de algumas células espermáticas defeituosas, durante o trajeto entre a cabeça e a cauda com uma redução do número de espermatozoides anormais (VARESI et al., 2013) e as mitocôndrias também sofrem modificações e tem papel fundamental na maturação (ANGRIMANI, 2013). As remodelações da membrana plasmática também são mudanças extremamente importantes na maturação que ocorrem na região da cabeça, corpo e da cauda (PARKS et al., 1991).

Durante a passagem através do epidídimo, o fluido o qual os espermatozoides são expostos sofrem alterações substanciais na composição, incluindo mudanças da osmolaridade, da proporção iônica, das reservas energéticas e de tipos proteicos. No espermatozoide, a membrana plasmática e as membranas acrossômicas alteram-se em relação às suas composições macromoleculares e à fluidez. A cromatina nuclear, por sua vez, é estabilizada por um aumento nas ligações dissulfídicas. Muitas alterações das membranas dos espermatozoides, que coincidem com a maturação espermática, são mediadas por proteínas secretadas em regiões restritas do ducto epididimário (algumas das quais são andrógeno dependentes) e por associações subsequentes dessas proteínas com os espermatozoides (OLIVA et al., 2009).

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).

Uma vez que os espermatozoides estão completamente maduros eles podem ser armazenados na região da cauda do epidídimo por dias até a ejaculação (YANAGIMACHI, 1994). O desenvolvimento de estratégias enzimáticas e não enzimáticas para proteger os espermatozoides

durante o período de armazenamento é outro papel atribuído à atividade de secreção do epitélio epididimário. Algumas das proteínas liberadas por esse epitélio parecem estar envolvidas na proteção dos espermatozoides tanto de reações de oxidação quanto de ataques bacterianos (ROBAIRE et al., 2000 E 2006; GATTI et al., 2004; GATTI et al., 2004).

Há uma série de proteínas epididimais no revestimento do espermatozoide que exercem seus efeitos sobre o gameta masculino na fêmea e não no trato masculino. Estas proteínas produzidas pelo epidídimo se ligam ao espermatozoide luminal, mas tornam-se funcionais no oviduto feminino. Algumas dessas moléculas são consideradas fatores decapacitantes e podem se ligar à superfície das células para evitar a ativação prematura dos espermatozoides (KOBAYASHI e BEHRINGER, 2003).

3.4 CLASSIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DO ESPERMATOZOIDE

A classificação de Blom e Christensen (1951) descreviam defeitos primários que eram os seguintes: cabeça piriforme, cabeça em raquete, macrocefalia, microcefalia picnose, cabeça anormal solta, forma abortiva, cauda enrolada na cabeça, forma dupla, inserção abaxial, defeito na peça intermediária, defeito do acrossoma e defeitos secundários os seguintes: cabeça normal solta, gota proximal, gota distal, bent tail e acrossoma (CBRA, 2013).

Em 1972, Blom classificou em defeitos maiores, defeitos menores, total de anormalidades e outros defeitos que são presença de leucócitos, de hemácias, de células espermatogênicas, medusa ou células epiteliais. Os defeitos maiores são: Na cabeça e no acrossomo; acrossomo, subdesenvolvidos, cabeça isolada normal, contorno anormal, estreita na base, piriforme, pequena anormal e pouch formation. Na peça intermediária; gota proximal, outros (fibrilação, edema, pseudogota, entre outros) e peça intermediária rudimentar. Na peça principal somente cauda fortemente dobrada. E também as formas teratológicas. Os defeitos menores são: cabeça delgada, gigante, curta larga e pequena anormal, cabeça isolada normal, defeitos de implantação, cauda dobrada, gota distal e cauda enrolada na porção terminal (CBRA, 2013).

3.5 TÉCNICAS PARA AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA

Para avaliação das características morfológicas podem ser usados esfregaços corados em microscópio óptico ou preparação úmida, em microscópio de contraste de fase ou interferência diferencial, associados ou não, sendo o mais indicado é o método de preparação úmida. Existem

também métodos de coloração específicos para determinadas partes dos espermatozoides (CBRA, 2013).

A técnica de lâmina corada é feita da seguinte forma: ao coletar o sêmen preparam-se dois ou três esfregaços bem delgados em lâminas limpas e aquecidas a 37°C, pinga uma gota de sêmen na lâmina que pode estar associado ou não ao corante. O esfregaço deve ser avaliado no microscópio óptico sobre imersão em aumento de 1000X. Devem ser contadas 200 células e anotados os defeitos de forma e estrutura. Os principais corantes usados para coloração de espermatozoides são vermelho congo (Cerovsky, 1976), eosina-nigrosina (Barth e Oko, 1989), rosa de bengala (Hafez e Hafez, 2004), entre outros (CBRA, 2013).

O método de preparação úmida é realizado da seguinte forma: deposita-se a quantidade de gotas de sêmen necessárias para obtenção de um aspecto leitoso, em um frasco contendo solução de formol-salina tamponada, podendo ou não ser preservada a amostra a 5°C. Então, coloca-se uma alíquota de sêmen diluído sobre a lâmina cobrindo-a com uma lamínula. A lâmina deve ser avaliada em microscópio de contraste ou interferência diferencial de fase, com objetiva de 100X, sob imersão. Deve-se avaliar pelo menos 200 células observando os defeitos de forma e estrutura (CBRA, 2013).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

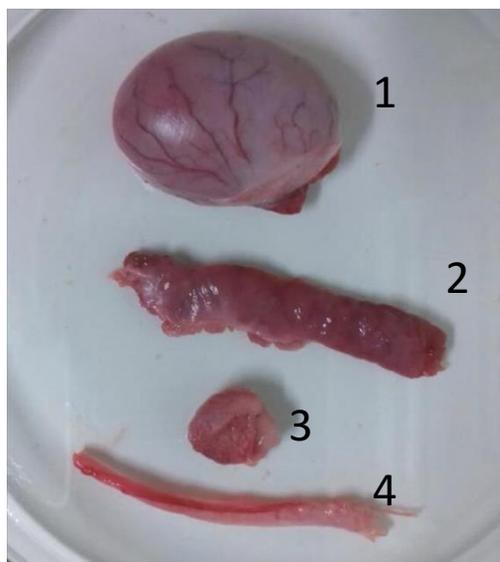
Foram utilizados dez animais machos adultos não selecionados da espécie canina, sem raça e idade definida, provenientes do projeto de castração de cães desenvolvido nas dependências do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia.

4.2 Coleta do sêmen

Após a orquiectomia dos animais, os testículos foram levados para o laboratório de reprodução animal em uma temperatura de 37°C. Em seguida, foi feita uma lavagem dos órgãos com soro fisiológico, para remover qualquer resíduo de sangue. Os testículos dos animais foram retirados junto com os ductos deferentes, dissecados e separados em porções: testículos, cabeça do epidídimo, cauda do epidídimo e ducto deferente (figura 1). Os testículos receberam um corte transversal no terço médio e foram lavados internamente com solução de PBS (Dulbecco modificado). Separadamente, a cabeça e cauda do epidídimo e o ducto deferente receberam diversos cortes, que foram pressionados e lavados com a mesma solução com o objetivo de liberar os espermatozoides. Foi utilizado em torno de 1,5 ml de solução em cada porção. Os líquidos resultantes das lavagens

foram recolhidos e identificados em microtubos de 5 ml. Em seguida acrescentou-se 1 ml de formol salina em cada frasco para preservação das células.

Figura 1. Dissecção e preparação dos testículos e epidídimos dos cães. (1) testículo, (2) cabeça/corpo epidídimo, (3) cauda do epidídimo e (4) ducto deferente.



4.3 Análise morfológica dos espermatozoides

A avaliação morfológica do sêmen, onde se verificou as patologias dos espermatozoides, foi realizada utilizando o método de preparação em câmara úmida sob microscopia óptica de contraste de fase, verificando a porcentagem de anormalidades dos espermatozoides em sua cabeça, peça intermediária e cauda (CBRA, 2013). Também foram preparadas lâminas coradas com rosa bengala e vermelho congo. Foi contado um total de 200 células de cada porção do trato reprodutivo avaliada.

O teste supravital foi feito através da coloração de espermatozoides, utilizando eosina-nigrosina, preparada com eosina Y (3,3g), nigrosina (20g), citrato de sódio (1,5g) e água destilada (300 ml) (BARTH E OKO, 1989). Para a preparação da lâmina, o corante foi aquecido à temperatura do sêmen, colocado uma gota de sêmen e uma de corante, feito o esfregaço, e posterior avaliação após secagem, em microscopia óptica. A avaliação foi feita em 100 células, verificando a porcentagem de vivos e mortos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As técnicas de lavagem do testículo e fatiamento seguido de lavagem da cabeça e cauda do epidídimo e do ducto deferente mostraram-se eficientes na recuperação das células espermáticas e

resultaram em bom volume de material para análise. Estudos tem confirmado a possibilidade de recuperação de células espermáticas de epidídimos com boa qualidade mesmo após decorrido várias horas da morte do animal (FERNÁNDEZ-SANTOS et al., 2009; MARTINEZ-PASTOR et al., 2005; SILVA e MOTA-FILHO, 2012).

A técnica de fatiamento epididimário foi semelhante a realizada por Kaab et al. (2003) em ovinos e por Fernández-Santos et al. (2009) em cervos vermelhos (*Cervus elaphus hispanicus*) que, como nesta pesquisa, também obtiveram elevada concentração de células espermáticas.

A tabela 1 mostra as porcentagens de alterações morfológicas verificadas nas quatro porções analisadas nos animais estudados.

Tabela 1 – Alterações morfológicas dos espermatozoides de cães verificadas no testículo, cabeça do epidídimo, cauda do epidídimo e ducto deferente (porcentagem).

Tipo de alteração	Testículo	Cabeça Epidídimo	Cauda Epidídimo	Ducto Deferente
Gota Citoplasmática Proximal	29	7	7	2
Contorno Anormal	5	1	0	0
Cauda Fortemente Dobrada ou Enrolada	5	17	21	19
Cauda Dobrada	4	5	4	5
Cauda Enrolada	2	0	8	6
Piriforme	0	1	0	0
Cabeça Isolada Normal	2	34	3	12
Gota Citoplasmática Distal	0	0	14	0
Total	47	65	57	44

A porcentagem média de espermatozoides com anormalidades nos espermatozoides epididimários dos cães foram de 47%, 65%, 57% e 44%, no testículo, na cabeça do epidídimo, na cauda do epidídimo e no ducto deferente, respectivamente. Observamos uma predominância de gota citoplasmática proximal (29%) no testículo e de distal na cauda de epidídimo (14%), com baixa incidência de anormalidades da cabeça do espermatozóide sendo 5% no testículo reduzindo durante a passagem no trato genital. Podemos notar também uma alta incidência de cabeças isoladas principalmente na cabeça do epidídimo e de defeitos de cauda nas porções epididimárias e ducto deferente. As alterações morfológicas de maior incidência foram gota citoplasmática proximal (GCP) e distal (GCD), cabeça isolada normal e cauda fortemente dobrada ou enrolada. Houve uma variação entre a quantidade e qualidade dos defeitos das células espermáticas no testículo, nas porções do epidídimo e ducto deferente, com alternância entre as quantidades das mesmas. Observou-se uma redução das gotas citoplasmáticas proximais de 29% no testículo para 2% no ducto deferente

mostrando assim a maturação das células na sua passagem pelo epidídimo. Rao et al. (1980) e Gatti et al. (2004) relatam que alta quantidade GCP estão presentes na saída testículos e diminuiu durante a passagem no trato genital, havendo aumento nos defeitos da cauda do espermatozoide quando atinge a cauda do epidídimo, semelhante ao observado neste estudo.

Há poucos relatos na literatura sobre morfologia de espermatozoides dentro do trato reprodutivo principalmente em canídeos. Em algumas outras espécies de animais como búfalos africanos (*Syncerus caffer*) Bartels et al. (1999) observaram valores de anormalidades próximos a deste estudo nos espermatozoides epididimários em torno de 50% de patologias totais e Lambrechts et al. (1999) verificaram de 25 a 31% de anormalidades, principalmente gotas citoplasmáticas, caudas dobradas, caudas enroladas, cabeças isoladas e espermatozóides de cabeça dupla. Também em cabra espanhola (*Capra pyrenaica*), Santiago-Moreno et al. (2006) encontraram valores menores de patologias epididimárias totais que os deste estudo ($23,2 \pm 3,5\%$).

A elevada porcentagem de anormalidades nos espermatozoides dos cães (acima de 44%) observada tanto no testículo, epidídimo e no ducto deferente, talvez seja devido ao fato que os animais utilizados neste estudo não foram selecionados previamente para reprodução e tinham raça e idade desconhecidas pois o material do estudo foi provenientes de orquiectomias em um projeto de controle populacional de cães.

A porcentagem de espermatozoides não reativos (vivos) e reativos (mortos) nas várias porções do trato reprodutivo dos cães estão mostradas na tabela 2.

Tabela 2 - Espermatozoides avaliados pelo teste supravital no testículo, cabeça e cauda do epidídimo e ducto deferente de cães (porcentagem).

	Testículo	Cabeça Epidídimo	Cauda Epidídimo	Ducto Deferente
Vivos	33	77	80	79
Mortos	67	23	20	21

No teste supravital verificamos que o número de espermatozoides mortos foi muito alto no testículo (67%) e foi reduzindo a quantidade ao passar pelo epidídimo chegando a 21% apenas no ducto deferente, o que mostra a seleção celular que o epidídimo faz com os espermatozoides durante a sua maturação, pois segundo Varesi et al. (2013) há uma remoção de algumas células espermáticas defeituosas durante o trajeto dos espermatozoides até a cauda do epidídimo.

6 CONCLUSÕES

As técnicas de corte de testículos, fatiamento com lavagem da cabeça e cauda do epidídimo e ducto deferente mostraram-se eficientes na obtenção de amostras de sêmen para análise morfológica.

Os espermatozoides dos cães apresentaram uma taxa significativa de anormalidades morfológicas, mas não houve grande diferença do total de patologias entre as quatro porções analisadas, apenas uma alternância nos tipos de anormalidades espermáticas ao longo do trato reprodutivo, mostrando a maturação e seleção celular que ocorre no epidídimo.

O epidídimo seleciona e retira do sêmen também as células mortas em suas diversas porções, o que ficou demonstrado no teste supravital.

Estes resultados podem contribuir para o conhecimento das características e índice de patologias de células espermáticas de cães, visando a aplicação em técnicas de reprodução assistida.

REFERÊNCIAS

ANGRIMANI, D.S.R. **Estudo da Maturação epididimária em cães**. 148p. Dissertação (Mestrado em reprodução animal). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2013.

ARROTÉIA, K.B., GARCIA, P.V., BARBIERI, M.F., JUSTINO, M.L., PEREIRA, L.A.V. The Epididymis: Embryology, Structure, Function and Its Role in Fertilization and Infertility. In: **Embryology - Updates and Highlights on Classic Topics**, Croatia: Intech, 2012. 27p. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/>. Acessado em: 26 de junho de 2017.

BARTELS, P.; LUBBE, K.; SMITH, R.L.; GODKE, R.A. Morphological changes of caudal epididymal spermatozoa of african buffalo (*Syncerus caffer*) after storage at 6°C. **Theriogenology**, v.51, p.279, 1999.

BASKA, K.M. MANANDHAR, G., FENG, D., AGCA, Y., TENGOWSKI, M.W., SUTOVSKY, M., YI, Y.J., SUTOVSKY, P. Mechanism of extracellular ubiquitination in the mammalian epididymis. **Journal of cellular physiology**, v. 215, n. 3, p. 684-696, 2008.

BRUEMMER, J.M. Collection and freezing of epididymal stallion sperm. **Animal Reproduction Science**, v.22, p.677-682, 2006.

CARY, J.A.; MADILL, S.; FARNSWORTH, K.; HAYANA, J.T.; DUOOS, L.; FAHNING, A. Comparison of electroejaculation and epididymal sperm collection techniques in stallion. **Canadian Veterinary Journal**, v.45, p.35-41, 2004.

CBRA - COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**, 3 ed., Belo Horizonte: CBRA, 2013, 104 p.

COOPER, T. G. The epididymis, cytoplasmic droplets and male fertility. **Asian Journal Andrology**, v. 13, n. 1, p. 130-138, 2011.

DACHEUX, J.L.; CASTELLA, S.; GATTI, L.J. & DACHEUX, F. Epididymal cell secretory activities and the role of the proteins in boar sperm epididymis. **Theriogenology**, v.63, n. 2, p. 319-341, 2005.

FERNÁNDEZ-SANTOS, M.R.; MARTINEZ-PASTOR, F.; MATIAS, D.; DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO, A.E.; ESTESO, M.C.; MONTORO, V.; GARDE, J.J. Effects of long-term chilled storage of red deer epididymides on DNA integrity and motility of thawed spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.111, p.93-104, 2009.

FERNÁNDEZ-SANTOS, M.R.; MARTINEZ-PASTOR, F.; MATIAS, D.; DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO, A.E.; ESTESO, M.C.; MONTORO, V.; GARDE, J.J. Effects of long-term chilled storage of red deer epididymides on DNA integrity and motility of thawed spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.111, n.1, p.93-104, 2009.

FOUCHECOURT, S.; METAYER, S.; LOCATELLI, A.; DACHEUX, F.; DACHEUX, J.L. Stallion epididymal fluid proteome: qualitative and quantitative characterization; secretion and dynamics changes of major proteins. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 6, p. 1790-1803, 2000.

GATTI, J.L., CASTELLA, S., DACHEUX, F., ECROYD, H., MÉTAYER, S., THIMON, V., DACHEUX, J.L. Post-testicular sperm environment and fertility. **Animal Reproduction Science**, v. 82, p. 321-339, 2004.

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, p. 321-339, 2004.

GUYONNET, B.; DACHEUX, F.; DACHEUX, J.L.; GATTI, J.L. The epididymal transcriptome and proteome provide some insights into new epididymal regulations. **Journal Andrology**, v. 32, n. 6, p. 651-664, 2011.

HERMO, L.; OKO, R., MORALES, C.R. Secretion and endocytosis in the male reproductive tract: a role in sperm maturation. **Internacional Review of Cytology**, v.154, p. 106-189, 1994.

HORI, T.; ATAGO, T.; KOBAYASHI, M.; KAWAKAMI, E.; Influence of different methods of collection from the canine epididymides on post-thaw caudal epididymal sperm quality. **Journal Veterinary Medical Science**, v.77, n.5, p.625–630, 2015.

KAABI, M.; PAZ, P.; ALVAREZ, M.; ANEL, E.; BOIXO, J.C.; ROUISSI, H.; HERRAEZ, P.; ANEL, L. Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered postmortem. **Theriogenology**, v.60, p.1249-1259, 2003.

KOBAYASHI, A., BEHRINGER, R.R. Developmental genetics of the female reproductive tract in mammals. **Nature Reviews Genetics**, v. 4, n. 12, p. 969- 980, 2003.

LAKOSKI, K.A.; CARRON, C.P.; CABOT, C.L.; SALING, P.M. Epididymal maturation and the acrosome reaction in mouse sperm: response to zona pelúcida develops coincident with modification of M42 antigen. **Biology of Reproduction**, v. 38, n. 1, p. 221-233, 1988.

LAMBRECHTS, H.; VAN NIEKERK, F.E.; COETZER, W.A.; CLOETE, S.W.P.; VAN DER HORST, G. The effect of cryopreservation on the survivability, viability and motility of epididymal african buffalo (*Syncerus caffer*) spermatozoa. **Theriogenology**, v.52, n.1, p.1241-1249, 1999.

LEGARE, C.; BERUBE, B.; BOUE, F.; LEFIEVRE, L.; MORALES, C.R.; EL-ALFY, M.; SULLIVAN, R. Hamster sperm antigen P26h is a phosphatidylinositol-anchored protein. **Molecular Reproduction Development**, v. 52, n. 2, p. 225-233, 1999.

MA, L.; YU, H.; NI, Z.; HU, S.; MA, W.; CHU, C.; LIU, Q.; ZHANG, Y. *Spink13*, an epididymis-specific gene of the Kazal-type serine protease inhibitor (SPINK) Family, is essential for the acrosomal integrity and male fertility. **Journal Biology Chemical**, v.288, n.14, p.10154-10165, 2013.

MARKS, S.L.; DUPUIS, J.; MICKELSEN, W.D.; MEMON, M.A.; PLATZ, C.C. Jr. Conception by use of postmortem epididymal semen extraction in a dog. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.15, p.1639-1640, 1994.

MARTINEZ-PASTOR, F.; CORUJO, A.R.D; ANEL, E.; HERRAEZ, P.; PAZ, P.; ANEL, L. Post mortem time and season alter subpopulation characteristics of Iberian red deer epididymal sperm. **Theriogenology**, v.64, n.4. p.958-974, 2005.

MARTINEZ-PASTOR, F.; GARCIA-MACIAS, V.; ALVAREZ, M.; CHAMORRO, C.; HERRAEZ, P.; PAZ, P.; ANEL, L. Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the caudal epididymis of Iberian red deer. **Theriogenology**, v.65, p.471-485, 2006.

MELO, C.M., PAPA, F.O., ALVARENGA, M.A. Como colher e congelar sêmen de epidídimo de reprodutores terminais ou mortos. In: Anais da 9ª Conferência Anual da ABRAVEQ, São Paulo. **Anais...**, São Paulo: ABRAVEQ. 2008.

MOTA FILHO, A.C.; SILVA, L.D.M. Recuperação e conservação de espermatozoides epididimários de mamíferos. **Acta Veterinária Brasileira**, v.6, n.1, p.1-8, 2012.

OLIVA, S.U.; RINALDO, P.A.; STUMPP, T. Biologia epididimária: maturação espermática e expressão gênica. **O Mundo da Saúde**, v.33, n.4, p.419-425, 2009.

PARKS, J.E.; HAMMERSTEDT, R.H. Development changes oncoming in the lipids of ram epididymal spermatozoa plasma membrane. **Biology of Reproduction**, v. 32, n. 3, p. 653-668, 1985.

RAO, A.R.; BANE, A.; GUSTAFSSON, B.K. Changes in the morphology of spermatozoa during their passage through the genital tract in dairy bulls with normal and impaired spermatogenesis. **Theriogenology**, v. 14, n. 1, p. 1-12, 1980.

SANTIAGO-MORENO, J.; TOLEDANO-DÍAZ, A.; PULIDO-PASTOR, A.; GÓMEZ-BRUNET, A.; LÓPEZ-SEBASTIÁN, A. Birth of live Spanish ibex (*Capra pyrenaica hispanica*) derived from artificial insemination with epididymal spermatozoa retrieved after death. **Theriogenology**, v.66, p.283–291, 2006.

SILVA, L.D.M.; MOTA-FILHO, A. Recuperação e conservação de espermatozoides epididimários de mamíferos. **Acta Veterinária Brasília**, v.6, n.1, p.1-8, 2012.

SULLIVAN, R. Male fertility markers, myth or reality. **Animal Reproduction Science**, v.82- 83, p. 341- 347, 2004.

THOMASSEN, R.; FARSTAD, W. Artificial insemination in canids: a useful tool in breeding and conservation. **Theriogenology**, v. 71, n. 1, p. 190-199, 2009.

THUZINE, A., MATAVALE, S., CHOUBINA, A. **O Mundo dos Animais**. Biologia, 7^a classe, República de Moçambique: Editora Escolar, 1991, p.64.

VARESI, S.; VERNOCCHI, V.; FAUSTINI, M.; LUVONI, G.C. Morphological and acrosomal changes of canine spermatozoa during epididymal transit. **Acta Veterinaria Scandinavia**, v. 55, n. 1, p. 17, 2013.

YANAGIMACHI, R.; KAMIGUCHI, Y.; MIKAMO, K.; SUZUKI, F. & YANAGIMACHI, H. (1985). Maturation of spermatozoa in the epididymis of the Chinese hamster. **American Journal of Anatomy**, v. 172, n. 4, p. 317-330, 1985.