

ESTUDO DA OCORRÊNCIA DE ESPERMATOZOIDES EM DIFERENTES SEGMENTOS DO APARELHO REPRODUTOR MASCULINO DE CÃES

THAINÃ MORALES ACOSTA¹; IZANI BONEL ACOSTA²; CARINE DAHL CORCINI³

¹UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS – acostathaina22@gmail.com

²UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS – izanibonel@hotmail.com

³UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS – corcincd@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O cão doméstico (*Canis lupus familiaris*) é reconhecido como o primeiro animal a ter sido domesticado pelo ser humano (Pendleton et al., 2018). Apesar disso, a sua origem ainda permanece em debate. Evidências obtidas a partir do genoma mitocondrial sugerem duas possibilidades: a domesticação pode ter ocorrido na Europa, entre 18 e 32 mil anos atrás (Thalmann et al., 2013), ou no sudeste asiático, há menos de 16 mil anos (Pang et al., 2009).

No que se refere ao sistema reprodutor masculino, este é composto pelos testículos, responsáveis pela produção de espermatozoides, além dos epidídimos, ductos eferente e deferente e da glândula prostática (CBRA, 2013). Nos cães, os epidídimos estão aderidos à superfície dorsolateral dos testículos, apresentando a cabeça posicionada na borda cranial e a cauda na borda caudal. Estruturalmente, o epidídimo consiste em um ducto longo e bastante enovelado que conecta os ductos eferentes ao ducto deferente, sendo dividido em três regiões: cabeça, corpo e cauda (SISSON; GROSSMAN, 1986).

Essa estrutura desempenha múltiplas funções essenciais, como a reabsorção do fluido proveniente dos túbulos seminíferos, a eliminação de gametas defeituosos e o armazenamento das células espermáticas normais (MURADÁS et al., 2006). Além disso, durante o percurso pelos diferentes segmentos do epidídimo, os espermatozoides passam por profundas modificações que permitem sua maturação gradual, capacitação e preparo para o reconhecimento e fertilização dos oócitos (FOUCHECOURT et al., 2000; ROBAIRE et al., 2006; TAJIK et al., 2007; COOPER, 2011; CONTRI et al., 2012; VARESI et al., 2013). Dessa forma, enquanto a espermatogênese tem início nos testículos, a maturação final dos gametas ocorre no epidídimo (VARRICCHIO et al., 1996).

Particularmente, a cauda do epidídimo atua como um reservatório de espermatozoides maduros, mantidos em repouso metabólico até serem utilizados (SOSTARIC et al., 2008; CABALLERO; FRENETTE; SULLIVAN, 2011). A recuperação dessas células possibilita sua aplicação em biotécnicas de reprodução assistida, como a inseminação artificial (PAPA et al., 2008; HEISE et al., 2010). Esse procedimento tem relevância inclusive em situações nas quais o animal apresenta limitações reprodutivas. Klinc et al. (2005), por exemplo, relataram a recuperação de espermatozoides epididimários de um cão castrado, com seis anos de idade e diagnosticado com hiperplasia prostática benigna. A inseminação artificial realizada a partir desse material resultou no nascimento de uma ninhada de oito filhotes, comprovando a viabilidade da técnica.

O presente trabalho teve como objetivo analisar a quantidade de espermatozoides e de outras células presentes em diferentes segmentos do sistema reprodutor masculino de cães, com ênfase no testículo, cabeça e cauda do epidídimo.

2. METODOLOGIA

Para a realização do presente experimento, foi utilizado um testículo esquerdo proveniente de um cão submetido à orquiectomia no Hospital de Clínicas Veterinárias (HCV) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), localizado no

campus Capão do Leão. Após a castração, o material foi acondicionado em solução salina estéril, mantido sob refrigeração a aproximadamente 4 °C e protegido da luz, a fim de preservar a integridade celular até o momento da preparação das lâminas. O testículo apresentava circunferência total de 7,4 cm, com peso registrado de 11,164 g.

Foram confeccionadas lâminas destinadas à análise em microscópio óptico de luz. Para a técnica de *imprint*, foram preparadas quatro lâminas: duas obtidas a partir do testículo seccionado ao meio e outras duas a partir da cabeça do epidídimo, também cortada longitudinalmente. Em seguida, utilizando a técnica de esfregaço, foram elaboradas duas lâminas adicionais: uma do testículo e uma da cauda do epidídimo. Para esta etapa, o sêmen foi cuidadosamente extraído de cada região e espalhado sobre a superfície da lâmina, formando o esfregaço.

Todas as lâminas confeccionadas foram deixadas para secagem à temperatura ambiente em condições assépticas. Posteriormente, foram coradas com corante hematológico rápido Panótico (Laborclin®), baseado na técnica de Romanowsky, e novamente deixadas em repouso até completa secagem. A análise foi realizada em microscópio de luz, utilizando objetiva de 40x, com o objetivo de quantificar os espermatozoides e outras células presentes em cada preparação, permitindo posterior comparação entre as diferentes regiões do aparelho reprodutor.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise morfométrica inicial revelou que o testículo utilizado apresentava circunferência de 7,4 cm e peso de 11,164 g, valores compatíveis com os relatados em cães de porte médio, segundo estudos prévios sobre biometria testicular (SILVA et al., 2019). Esses parâmetros são relevantes, pois indicam condições fisiológicas adequadas do órgão no momento da coleta, garantindo a representatividade das lâminas confeccionadas.

Nas preparações realizadas pela técnica de *imprint*, tanto no testículo cortado ao meio (Figuras 1 e 2) quanto na cabeça do epidídimo (Figuras 3 e 4), foi possível observar a presença de células germinativas em diferentes estágios de desenvolvimento, além de espermatozoides já diferenciados. A quantidade de espermatozoides visualizada variou entre os segmentos analisados, sendo mais abundante nas amostras provenientes da cabeça do epidídimo, o que está de acordo com o papel dessa estrutura no acúmulo inicial de gametas (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2017).

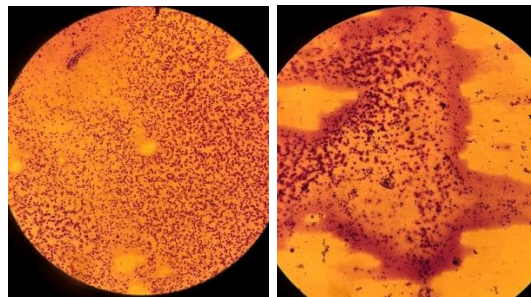
As lâminas obtidas pela técnica de esfregaço, confeccionadas a partir de extratos do testículo (Figura 5) e da cauda do epidídimo (Figura 6), também evidenciaram diferenças marcantes na proporção de células observadas. No testículo, prevaleceram células da linhagem germinativa, como espermatogônias e espermatócitos, enquanto na cauda do epidídimo observou-se predominância de espermatozoides mais íntegros e com aspecto maduro, confirmando a função desta região como principal local de armazenamento antes da ejaculação, como descrito por França e Russell (1998).

A coloração pelo corante hematológico rápido Panótico baseada na técnica de Romanowsky (Laborclin) possibilitou boa visualização. Esse tipo de coloração já é consolidado para análises citológicas por sua praticidade e eficiência (PIZZOL et al., 2012).

Os achados deste estudo corroboram a literatura quanto à organização funcional do sistema reprodutor masculino canino, em que o testículo atua principalmente como local de produção de células germinativas, a cabeça do epidídimo como região inicial de acúmulo e início da maturação espermática, e a

cauda do epidídimo como reservatório de gametas prontos para serem eliminados no momento da ejaculação. A análise microscópica, portanto, demonstrou coerência entre a distribuição celular e a fisiologia esperada dessas estruturas, destacando a importância de abordagens citológicas simples, como o imprint e o esfregaço, na caracterização da dinâmica espermato gênica em cães.

Figuras 1 e 2: Visualização do testículo cortado ao meio por técnica de *imprint*.



Figuras 3 e 4: Visualização da cabeça do epidídimo por técnica de *imprint*.

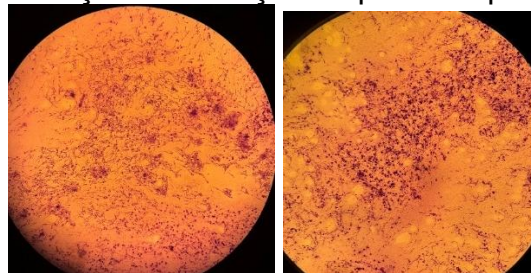


Figura 5: Visualização do testículo cortado ao meio por técnica de esfregaço.

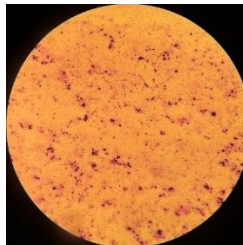
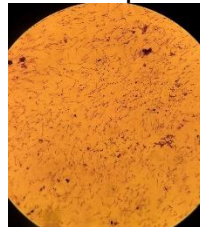


Figura 6: Visualização da cauda do epidídimo por técnica de esfregaço.



4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitiram observar a presença de espermatozoides e de outras células em diferentes segmentos do sistema reprodutor masculino canino, confirmando que há variação qualitativa e quantitativa entre as regiões analisadas. No testículo e na cabeça do epidídimo, a quantidade de espermatozoides observada foi reduzida, predominando células germinativas em diferentes estágios de maturação. Em contrapartida, a cauda do epidídimo

apresentou maior concentração de espermatozoides, condizendo com sua função de armazenamento e maturação final. Dessa forma, o trabalho atingiu seu objetivo de comparar os diferentes segmentos do aparelho reprodutor, reforçando a importância de cada região na espermatogênese e no transporte espermático. Além disso, o estudo evidencia o valor de técnicas simples, como imprint e esfregaço, associadas à coloração Panótico, para fins de avaliação didática e investigativa em histologia reprodutiva.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CABALLERO, J.; FRENETTE, S.; SULLIVAN, R.** Post testicular sperm maturational changes in the bull: important role of the epididymosomes and prostasomes. *Veterinary Medicine International*, London, ID 757194, 2011.
- CBRA – COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL.** *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. 3. ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. 104 p.
- CONTRI, A.; GLORIA, A.; ROBBE, D.; DE AMICIS, I.; CARLUCCIO, A.** Characteristics of donkey spermatozoa along the length of the epididymis. *Theriogenology*, New York, v.77, p.166–173, 2012.
- COOPER, T.G.** The epididymis, cytoplasmic droplets and male fertility. *Asian Journal of Andrology*, Shanghai, v.13, p.130–138, 2011.
- FOUCHECOURT, S.; METAYER, S.; LOCATELLI, A.; DACHEUX, F.; DACHEUX, J.L.** Stallion epididymal fluid proteome: qualitative and quantitative characterization; secretion and dynamic changes of major proteins. *Biology of Reproduction*, Champaign, v.62, p.1790–1803, 2000.
- FRANÇA, L. R.; RUSSELL, L. D.** The testis of domestic animals. In: **REGADERA, J.; MARTÍNEZ-GARCÍA, F.** (eds.). *Male Reproduction: A Multidisciplinary Overview*. Madrid: Churchill Livingstone, 1998. p.197-219.
- HEISE, A.; KÄHN, W.; VOLKMANN, D.H.; THOMPSON, P.N.; GERBER, D.** Influence of seminal plasma on fertility of fresh and frozen-thawed stallion epididymal spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, Amsterdam, v.118, p.48-53, 2010.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J.** *Histologia Básica: texto e atlas*. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.
- 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. *Reproduction Domestic Animal*, Berlin, v.40, p.559-561, 2005.
- MURADÁS, P.R.; WEISS, R.R.; KOZICKI, L.E.; GRANEMANN, L.C.; SANTOS, I.W.; PIMPÃO, C.T.** Alguns parâmetros de viabilidade de espermatozoides equinos colhidos por vagina artificial e por lavagem da cauda do epidídimo. *Archives of Veterinary Science*, Curitiba, v.11, p.69-74, 2006.
- PANG, J-F. et al.** mtDNA data indicate a single origin for dogs south of Yangtze River, less than 16,300 years ago, from numerous wolves. *Molecular Biology and Evolution*, Oxford, v.26, n.12, p.2849-2864, 2009.
- PAPA, F.O.; MELO, C.M.; FIORATTI, E.G.; DELL'AQUA JR, J.A.; ZAHN, F.S.; ALVARENGA, M.A.** Freezing of stallion epididymal sperm. *Animal Reproduction Science*, Amsterdam, v.107, p.293-301, 2008.
- PENDLETON, A.L. et al.** Comparison of village dog and wolf genomes highlights the role of the neural crest in dog domestication. *BMC Biology*, London, v.16, n.64, 2018.
- PIZZOL, D. et al.** Diagnostic value of cytology in canine reproductive tract lesions: comparison of different staining methods. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, Columbia, v.24, n.6, p.1109-1116, 2012.
- ROBAIRE, B.; HINTON, B.T.; ORGEBIN-CRIST, M.C.** The epididymis. In: **NEILL, J.D.** (Ed.). *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. 3. ed. San Diego: Elsevier/Academic Press, 2006. p.1071–1148.
- SILVA, A. R. et al.** Biometria testicular em cães: parâmetros para avaliação reprodutiva. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v.43, n.3, p.121-128, 2019.
- SISSON, S.; GROSSMAN, J.D.** *Anatomia dos animais domésticos*. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986. 2v.
- SOSTARIC, E.; AALBERTS, M.; GADELLA, B.M.; STOUT, T.A.E.** The roles of the epididymis and prostasomes in attainment of fertilizing capacity by stallion sperm. *Animal Reproduction Science*, Amsterdam, v.107, p.237–248, 2008.
- TAJIK, P.; ARMAN, A.; TAKTAZ, T.** Bovine epididymal sperm morphology obtained from caput, corpus and cauda epididymides. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, Faisalabad, v.10, p.3936–3939, 2007.
- THALMANN, O. et al.** Complete mitochondrial genomes of ancient canids suggest a European origin of domestic dogs. *Science*, Washington, v.342, n.6160, p.871-874, 2013.
- VARESI, S.; VERNOCCHI, V.; FAUSTINI, M.; LUVONI, G.C.** Morphological and acrosomal changes of canine spermatozoa during epididymal transit. *Acta Veterinaria Scandinavica*, London, v.55, n.17, 2013.
- VARRICCHIO, E.; LANGELLA, M.; MAHARIAN, V.; PAINO, G.** Structure and function of mammalian epididymis. *Acta Medica Veterinaria*, Belgrado, v.42, p.221-234, 1996.