

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**AVALIAÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES RECUPERADOS DO
EPIDÍDIMO DE CÃES ADULTOS EM DIFERENTES TEMPOS APÓS
ORQUIECTOMIA**

EDIANE OLIVEIRA DE AMORIM

VILA VELHA
DEZEMBRO / 2012

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**AVALIAÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES RECUPERADOS DO
EPIDÍDIMO DE CÃES ADULTOS EM DIFERENTES TEMPOS APÓS
ORQUIECTOMIA**

Dissertação/tese apresentada a Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

EDIANE OLIVEIRA DE AMORIM

VILA VELHA
DEZEMBRO / 2012

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

A524a Amorim, Ediane Oliveira de.

Avaliação de espermatozoides recuperados do epidídimo de cães adultos em diferentes tempos após orquiectomia / Ediane Oliveira de Amorim. – 2012.

30 f.: il.

Orientadora: Flaviana Lima Guião Leite.

Dissertação (mestrado em Ciência Animal) - Universidade Vila Velha, 2012.

Inclui bibliografias.

1. Cão - Cirurgia. 2. Espermatozoides – conservação. 3. Espírito Santo – Condições ambientais. I. Leite, Flaviana Lima Guião. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 636.70897

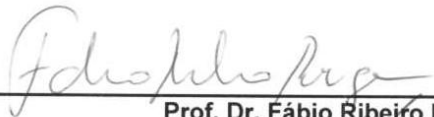
EDIANE OLIVEIRA DE AMORIM

**AVALIAÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES RECUPERADOS DO
EPIDÍDIMO DE CÃES ADULTOS EM DIFERENTES TEMPOS
APÓS ORQUIECTOMIA**

Dissertação/tese apresentada a
Universidade Vila Velha, como pré-
requisito do Programa de Pós -
graduação em Ciência Animal, para
a obtenção do grau de Mestre em
Ciência Animal.

Aprovada em 27 de dezembro de 2012,

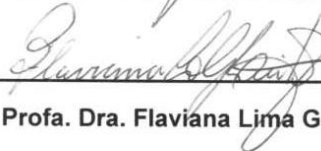
Banca Examinadora:



Prof. Dr. Fábio Ribeiro Braga – UVV



Prof. Dr. Paulo Dias Ferreira Júnior – UVV



Profa. Dra. Flaviana Lima Guião Leite – UVV

(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar à Deus, por me mostrar a cada dia como vale a pena ser fiel.

Aos animais do projeto, sem a contribuição deles nada seria possível.

Ao meu esposo Wanderson, que nunca mede esforços para me deixar feliz.

Aos meus filhotes Ian (8 anos) e Erik (9 meses), meus amores, alegria e realizações, presentes de Deus.

A minha irmã Edilamar, sem você não seria possível escrever sequer uma linha dessa dissertação, obrigada pelo cuidado com meus filhotes.

Aos meus sobrinhos Amanda e Guilherme, pelo carinho com Ian e Erik.

A minha irmã Edilene, sempre presente quando preciso.

A minha cunhada Karla, por cuidar dos meus filhotes quando viajamos para Santa Teresa na campanha de esterilização.

A minha orientadora Flaviana, pelo carinho, paciência e ajuda sempre.

A minha secretária Carla, pela alegria e carinho para com os meus filhotes.

Aos meus animais que hoje não estão mais comigo, Suzane, Pinguinho, Thorzinho, Vitória, Lucy e Snoopy, muitas saudades e lindas lembranças.

Aos meus animais aqui presente, Thorzão, Cizinha, Bibi, Charlotty, Xitara e Nego (emprestado), pela agitação e companhia sempre.

Aos professores que gentilmente aceitaram compor a banca.

A equipe de anestesia do Hospital Veterinário, sempre muito prestativa.

A professora Luciana e professora Séfora, pelo empenho em conseguir os animais para atingir o número necessário para o projeto.

A residente de cirurgia Talita, por auxiliar a conseguir mais cães.

A Francielle, pela ajuda com a normatização, Deus escolhe as pessoas para fazerem parte de nossa trajetória.

Ao professor Leandro, mais que professor, hoje um grande amigo.

Ao professor João Loss, pela ajuda com as análises estatística.

Ao Edson secretário do mestrado, sempre muito prestativo.

A minha cunhada Ana Cristina Rodrigues, sempre pronta para ajudar.

Ao meu sogro Beto, pelo carinho, sempre pronto para me agradar.

Ao meu pai Olímpio, que nos 13 anos que esteve presente na minha vida, me ensinou a ter determinação, coragem e honestidade, muitas saudades.

"Descobri como é bom chegar quando se tem paciência. E para se chegar, onde quer que seja, aprendi que não é preciso dominar a força, mas a razão.

É preciso, antes de mais nada, querer. **Amyr Klink**

RESUMO

AMORIM, Ediane Oliveira, M.Sc., Universidade Vila Velha – ES, dezembro de 2012.

Avaliação de espermatozóides recuperados de epidídimo de cães adultos em diferentes tempos após orquiectomia. Orientadora: Flaviana Lima Guião Leite.

Atualmente a conservação de animais selvagens de vida livre é influenciada por diversos fatores. No caso das populações de carnívoros, podemos citar como aspectos que as pressionam de maneira negativa a destruição e fragmentação de seus habitats, e sua caça, assim como a de suas presas, pelo homem. A técnica de coleta de espermatozóides epididimais pode ser a última chance para assegurar a preservação do material genético após lesão ou morte do animal. O objetivo desse estudo foi avaliar a viabilidade dos espermatozóides do epidídimo nas condições climáticas de nosso estado, Espírito Santo, Brasil, simulando a morte de canídeos vítimas de atropelamento nas rodovias do estado. Foram coletados testículos de cães provenientes das campanhas de esterilização organizadas pela equipe do Hospital Veterinário Ricardo Alexandre Rippler da Universidade Vila Velha-ES, bem como os procedimentos eletivos efetuados no mesmo hospital. Foram utilizados 21 cães com idade entre 1 e 10 anos de várias raças, hípidos, não criptorquídicos, totalizando 42 epidídimos, foi realizada a recuperação dos espermatozóides em temperatura ambiente, utilizando o método de fatiamento do epidídimo, por 7 horas, em intervalos de uma hora a 7 horas utilizando 3 cães diferentes em cada hora de intervalo. Como esperado, observou-se um declínio da qualidade espermática com o aumento do tempo pós-orquiectomia. Os espermatozóides colhidos da cauda de epidídimos e mantidos à temperatura ambiente foram considerados viáveis por 7 horas pós-orquiectomia. Motilidade total e motilidade progressiva dos espermatozóides se manteve satisfatória mesmo após 7 horas de intervalo, caracterizando viabilidade espermática aceitável. **CONCLUSÕES:** Com os resultados obtidos nessa pesquisa, outros projetos podem ser realizados utilizando métodos de análise e técnicas complementares como: avaliar com corante para análise de vitalidade, resfriar um testículo e manter outro em temperatura ambiente e análise morfológica dos espermatozóides, corroborando com resultados anteriores.

PALAVRAS CHAVE: conservação, espermatozóides, epidídimo, animais selvagens.

ABSTRACT

AMORIM, Ediane Oliveira, M.Sc., Universidade Vila Velha – ES, dezembro de 2012.

Avaliação de espermatozóides recuperados de epidídimo de cães adultos em diferentes tempos após orquiectomia. Orientadora: Flaviana Lima Guião Leite.

Currently the conservation of wild animals living free is influenced by several factors. In the case of populations of carnivores, we can cite as aspects that negatively pressuring the destruction and fragmentation of their habitats, and hunting, as well as their prey, by man. The collection technique epididymis sperm may be the last chance to ensure the preservation of genetic material from injury or death of the animal. The aim of this study was to evaluate the viability of spermatozoa in the epididymis climate of our state, Espírito Santo, Brazil, simulating death of canids victims of trampling on the highways of the state. Testes were collected from dogs of sterilization campaigns organized by the staff of the Veterinary Hospital of the University Rippler Alexandre Ricardo Vila Velha-ES, as well as elective procedures performed at the same hospital. 21 dogs were used aged 1 to 10 years of various races, healthy, non cryptorchid, totaling 42 epididymis was performed in the recovery of spermatozoa room temperature using the method of slicing the epididymis, for 7 hours, at intervals of one hours to 7 hours using three different dogs in each time interval. As expected, there was a decline in sperm quality with increasing time after orchiectomy. Sperm collected from the tail of the epididymis and kept were considered viable room temperature for 7 hours after orchiectomy. Motilidde total and progressive motility of spermatozoa remained satisfactory even after 7 hours apart, characterized sperm viability acceptable. **CONCLUSIONS:** With the results obtained in this research, other projects can be performed using analytical methods and complementary techniques such as: assessing dye for analysis of vitality, cool a testicle and another to maintain temperature and morphological analysis of sperm, confirming previous results.

Key words: conservation, wildlife, reproduction, epididymis.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	6
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	8
3 REFERÊNCIAS.....	16
4 CAPÍTULO I.....	21
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	30

1 INTRODUÇÃO

Atualmente a conservação de animais selvagens de vida livre é influenciada por diversos fatores e no caso das populações de carnívoros, podemos citar como aspectos negativos a destruição e fragmentação de seus habitats, a sua caça, e de suas presas, que levam à diminuição das populações e até mesmo a sua extinção (Deem et. al., 2005).

Uma grande dificuldade encontrada pelos pesquisadores que trabalham com reprodução de animais silvestres reside nas restrições de acesso aos espécimes de vida livre e cativeiro, fazendo com que o número reduzido de indivíduos dificulte a obtenção de informações estatisticamente significativas. O estudo de aspectos básicos da reprodução é importante para fornecer informações que auxiliem no desenvolvimento de tecnologias em reprodução assistida (Wildt, 1989).

Por estarem no topo de cadeia alimentar, os carnívoros, de modo geral, são utilizados como animais bandeira para conservação das demais espécies, ou seja, os projetos de conservação, como: Jaguar Conservation Network, Projeto Conviver gente & onças, têm uma abrangência multiplicada em vista da área necessária para caça e refúgio. Neste sentido, são mais abundantes estudos em reprodução assistida em felinos que qualquer outro grupo silvestre, como: Avaliação da capacidade de penetração de sêmen congelado de onça pintada (*Panthera onça*) em oócitos heterólogos (Paz et. al., 2000), Avaliação do espermograma de leões africanos (*Panthera leo*, Linnaeus, 1758) mantidos na Fundação Parque Zoológico de São Paulo (Miya et. al., 2007), Cycle and duration of the seminiferous epithelium in puma (*Puma concolor*) (Leite et. al., 2006). Também inúmeros trabalhos são desenvolvidos em carnívoros domésticos visando a utilização destes como modelos experimentais para aplicação em animais silvestres (Paula, 2011), como: Avaliação Clínica, Citológica e Seminal de Gatos Domésticos (*Felis Catus*) Para Seleção de Reprodutores (Vieira et. al., 2010), Inseminação artificial em gatos domésticos utilizando sêmen criopreservado (Villaverde, Lopes, 2007).

A aplicação de técnicas de reprodução assistida em espécies selvagens ameaçadas de extinção, como inseminação artificial e fertilização *in vitro*, surge

como método alternativo com o intuito de minimizar a diminuição da variabilidade genética das populações. A habilidade para fertilizar oócitos *in vitro* tem como vantagem a maior produção de animais ameaçados de extinção, a maior produção de animais provenientes de mães de alto valor genético, já mortas, podendo ainda ser utilizada para avaliar a fertilidade dos animais (Paz et. al., 2000).

Os espermatozóides podem ser obtidos diretamente da cauda do epidídimo e ducto deferente. É um recurso importante em casos de animais de alto valor genético ou de grande estima, que precisam ser esterilizados ou que vêm a óbito, tais espermatozóides obtidos por esta técnica são morfológicamente viáveis e mantêm a capacidade de sofrer capacitação, ligar-se à zona pelúcida e fecundar o oócito (Tsutsui et. al., 2003).

Segundo Borges et. al. (2009), os espermatozóides do epidídimo fornecem embriões de melhor qualidade, quando comparados com embriões derivados de espermatozóides testicular.

Muitos métodos de recuperação são descritos e variam dependendo do autor e da espécie animal. Nos animais de companhia, devido ao tamanho do epidídimo, o método de preferência é o fatiamento que consiste em cortar ou fatiar a cauda do epidídimo e deixar repousar em um meio diluidor, desta maneira, os espermatozóides migram para o meio e são recuperados através de filtração (Mota Filho & Silva, 2012).

Tedford et al. (1995) indicaram que o lobo-guará, o cachorro-do-mato e o cão doméstico derivem de um ancestral semelhante ao lobo, e apresenta uma árvore filogenética em concordância com os estudos cariotípicos e biomoleculares. Ou seja, que essas três espécies constituem um grupo monofilético e possuem o mesmo padrão de ramificação evolutiva (Novais et al., 2005).

Neste sentido o estudo do uso de espermatozóides viáveis de carnívoros recuperados do epidídimo após a morte, pode ser mensurado através do uso de espermatozóides obtidos do epidídimo de cães domésticos após a castração, para definição de protocolos de reprodução assistida em carnívoros selvagens.

O objetivo desse estudo foi avaliar a viabilidade dos espermatozóides do epidídimo nas condições climáticas do Espírito Santo, simulando a morte de canídeos vítimas de atropelamento nas rodovias do estado.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O Brasil é o país de maior biodiversidade do Planeta, mas os biomas e os ecossistemas brasileiros estão sofrendo com os impactos ambientais provocados principalmente pelas ações antrópicas (Silva et. al., 2008).

Desde a antiguidade o homem vem fragmentando os biomas e ecossistemas em consequência da adoção do modo de organização social cumulativo, onde os recursos explorados são maiores que os necessário para sobrevivência. A fragmentação de hábitat causada pela ação humana vem sendo um dos grandes desafios para a biologia da conservação, já que aumenta o risco de extinção de espécies (Prado et al., 2006).

No início do século XXI, pode-se ter perdido um milhão ou mais de espécies de plantas, animais e outros organismos (Corson, 1996).

Alguns destes processos de extinção são naturais, decorrentes da própria evolução das espécies, as principais causas da perda da diversidade biológica atualmente são a destruição do habitat, a introdução de espécies exóticas e a predação direta. A conservação das espécies está intrinsecamente ligada à manutenção da variabilidade genética, quando uma população é isolada geograficamente e fica sujeita à uniformidade genética, vários fatores se aliam para desencadear o processo de extinção, entre estes fatores, estão a maior susceptibilidade a doenças, o aumento de anormalidades espermáticas e diminuição da fertilidade, o desbalanceamento endócrino de hormônios reprodutivos afetando a espermatogênese, a ovulação e a morbidade e mortalidade perinatal (Paula, 2011).

As espécies que conseguem escapar dos riscos de extinção ainda podem estar sujeitas aos efeitos da endogamia que ocasiona normalmente baixa eficiência reprodutiva (Caldeira, 2007).

Com a fragmentação das matas, diminuição de presas e aumento na disponibilidade de animais domésticos em áreas agrícolas, alguns carnívoros passam a utilizar desse novo recurso alimentar entrando em conflito com os proprietários rurais e mesmo na periferia de cidades. É possível a visualização de cachorros-do-mato como animais sinantrópicos, sobrevivendo de restos alimentares

no período noturno em cidades e estradas, o que gera uma grande ocorrência de atropelamentos (Cassella et al., 2006).

A construção de estradas é um mecanismo de fragmentação de alto impacto, removendo a cobertura vegetal original, gerando efeito de borda e alterando a função e a estrutura da paisagem. Este tipo de modificação acarreta sérios impactos à fauna de vertebrados em processos de deslocamento para superar rodovias, como barreira artificial, elevando o índice de mortalidade (Prado et al., 2006).

Estratégias de conservação objetivam manter e, se possível, aumentar a biodiversidade, a ação ideal para se alcançar esses objetivos é preservar o hábitat da espécie (Paula, 2011).

No início do conhecimento científico as abordagens baseavam-se em metodologias hoje consideradas simplistas, mas extremamente importantes na sedimentação dos conceitos atuais. O estudo do processo espermatogênico teve seu início já nos primórdios desde a evolução do pensamento científico. Registros de Aristóteles, anteriores a 300 AC, relataram a utilização da castração como método de estudo da biologia reprodutiva (Johnson, 1991).

Os órgãos genitais masculinos são os dois testículos, as glândulas reprodutivas essenciais (onde se realiza a produção de espermatozóides e testosterona) com suas coberturas e anexos, o epidídimo (que acumula e transporta o espermatozóide), o ducto deferente, o ducto dos testículos, as glândulas seminais (vesícula seminal no eqüino), a próstata (órgão músculo glandular), as duas glândulas bulbouretrais (ou de Cowper), a uretra masculina, um canal que transmite as secreções reprodutivas e urinárias e o pênis, o órgão copulatório masculino (Martucci et. al., 2011).

O testículo apresenta estrutura similar para várias espécies de mamíferos, variando, em geral, a proporção volumétrica de seus componentes. Sendo um órgão de funções endócrinas e exócrinas, tem como estrutura uma cápsula conjuntiva que o envolve e envia septos para o seu interior, formando lóbulos. Estes são divididos em compartimento tubulares e intertubulares. O primeiro é constituído pelos túbulos seminíferos, com suas células germinativas e de Sertoli, onde são produzidos os espermatozóides e fluidos. Já o segundo é constituído por vasos sanguíneos e

linfáticos, nervos, tecido conjuntivos e células de Leydig, produtoras de andrógenos (Soares, 2006).

O testículo dos mamíferos está geralmente localizado fora da cavidade abdominal, em uma prega cutânea denominada escroto. Esta localização testicular é importante na maioria das espécies de mamíferos devido à necessidade de uma temperatura inferior à temperatura abdominal, para a manutenção das funções testiculares (Junqueira & Carneiro, 2005).

Há uma relação direta entre o peso testicular e produção espermática, porém, a quantidade de espermatozóides produzida é sempre maior que o número necessário para a fecundação. O tamanho do testículo não acompanha proporcionalmente o tamanho corporal, uma vez que animais de grande tamanho corporal produziriam um enorme excedente (Azevedo et al., 2006).

A espermatogênese é um processo sincrônico e regular de diferenciação celular pelo qual uma espermatogônia tronco é gradativamente diferenciada numa célula haplóide altamente especializada, o espermatozóide. Essa diferenciação envolve três classes de células germinativas: as espermatogônias, os espermatócitos e as espermátides. Esse processo, que ocorre nos túbulos seminíferos, dura em torno de 40 a 60 dias na maioria dos mamíferos estudados (Costa, Paula, 2004).

Esta transformação complexa e organizada envolve três fases, baseando-se em considerações morfológicas e funcionais: (1) a fase proliferativa (espermatogonial) na qual as células sofrem rápidas e sucessivas divisões mitóticas; (2) fase meiótica (espermatócitos), na qual o material genético é duplicado e passa por recombinação genética; e (3) fase de diferenciação ou espermatogênica (espermátides), na qual as espermátides sofrem intensas modificações, transformando-se em espermatozóides. É um processo contínuo em que cada fase é caracterizada por mudanças morfológicas e bioquímicas dos componentes do citoplasma e do núcleo (Corout et al., 1970).

É muito importante para a espermatogênese a presença e expressão de várias proteínas específicas para cada uma das suas fases. Dentre estas proteínas, estão as histonas e protaminas que atuam na fase final da espermatogênese (Silva 2003).

Os túbulos seminíferos são conectados à cabeça do epidídimo pela “rete testis”, formada por pequenos dutos eferentes dentro dos quais ocorre a absorção dos fluídos oriundos da “rete testis” e o aparecimento de secreções contendo antígenos e proteínas, ambos necessários ao estabelecimento da motilidade espermática. Portanto, para alcançarem a cabeça do epidídimo os espermatozóides transitam pelos dutos eferentes, movimento este realizado com o auxílio das células epiteliais ciliadas e pela contração da musculatura lisa das paredes dos dutos (Muradás, 2007).

Benoit, (1926) descreveu pela primeira vez o epidídimo como sendo dividido em quatro regiões anatômicas, o segmento inicial, cabeça, corpo e cauda, subsequentemente outros sistemas tem sido propostos para a divisão do epidídimo em diferentes segmentos ou regiões. Em todas as espécies de mamíferos examinadas até à data, todas as regiões do epidídimo é ainda organizada em lóbulos separados por septos de tecido conjuntivo. Estes septos não somente servem como suporte interno para o órgão, mas têm sido propostos para proporcionar uma separação funcional dos lóbulos que permitem a expressão seletiva de genes e proteínas individualmente dentro de cada lóbulo. A extensão do epidídimo é um túbulo estreito, o canal deferente, que é rodeada por uma camada muito espessa de tecido muscular. O canal deferente conecta-se à uretra que desemboca para o exterior do corpo (Robaire et. al, 2006).

A regulação da síntese de proteínas e secreções epididimais no lúmen é realizada por andrógenos testiculares, que variam de um segmento para outro do epidídimo, resultando numa mistura complexa de proteínas epididimais que interagem com o espermatozóide no lúmen do epidídimo. O processo de maturação dos espermatozóides depende de uma sequência de modificações espermáticas resultantes da interação da superfície do espermatozóide com os diferentes fluídos intraluminais (Rodriguez et. al., 2001).

O estudo da biologia de espermatozóides é crucial para o desenvolvimento das técnicas de armazenamento à longo prazo que possam ser utilizados em combinação com um banco de recursos de genoma cativo para complementar a conservação *in situ* (Keeley et. al., 2011).

No entanto, estratégias de conservação *in situ* nem sempre são suficientes na propagação de pequenas populações e manutenção de uma

adequada variabilidade genética. Neste sentido, estratégias de conservação *ex situ* objetivam auxiliar na conservação de uma população geneticamente viável por meio de estratégias de reprodução assistida, e criopreservação de fontes genéticas. Tecnologias de reprodução assistida como inseminação artificial, fertilização *in vitro* e transferência de embriões, vêm sendo cada vez mais aplicadas. Além da investigação do potencial reprodutivo destes animais, estas tecnologias têm como aplicação a translocação apenas do material genético entre populações de vida livre isoladas e entre populações de vida livres e animais em cativeiro, podem permitir o aumento no nascimento de filhotes de pais selecionados de forma a aumentar a diversidade da população e reduzir o intervalo entre os partos. A aplicação da inseminação artificial reduz também os riscos de transmissão de doenças infecciosas durante a cópula e os problemas com injúrias físicas durante a cópula (Paula 2011).

A aplicação de técnicas de reprodução assistida em espécies selvagens ameaçadas de extinção, como inseminação artificial e fertilização *in vitro*, surge como método alternativo com o intuito de minimizar a diminuição da variabilidade genética das populações. A habilidade para fertilizar oócitos *in vitro* tem como vantagem a maior produção de animais ameaçados de extinção, a maior produção de animais provenientes de mães de alto valor genético, já mortas, podendo ainda ser utilizada para avaliar a fertilidade dos animais. Várias técnicas têm sido desenvolvidas para melhorar e simplificar processos de fertilização *in vitro* em mamíferos. (Paz et. al., 2000).

Um dos objetivos da conservação é a manutenção da diversidade genética da população de animais. Bancos de recursos de genoma podem contribuir para isso, através do fornecimento de uma fonte de genes que pode ser infundido em pequenas populações ou populações fragmentadas e, assim, compensar os efeitos de pressões de seleção não-naturais, o que levam a endogamia. Em vez do transporte de animais sensíveis, estressados, a heterogenicidade genética poderia ser mantida por meio de envio de gametas ou embriões. Também pode ser possível a inseminação artificial de fêmeas de vida livre com esperma de machos selvagens cativos ou de população caçada (Bissett, Bernard, 2004).

A coleta de espermatozoides epididimais pode ser a última chance para assegurar a preservação do material genético após lesão ou morte do animal. Nos

mamíferos, o epidídimo possuiu diversas funções, ressaltando-se a reabsorção dos fluídos dos túbulos seminíferos, promovendo a concentração do sêmen, o transporte dos espermatozóides, a eliminação dos espermatozóides defeituosos, a maturação e o armazenamento dos espermatozóides (Muradás et al., 2006). Os espermatozóides ejaculados sobrevivem por 24 horas ou mais fora do epidídimo e aqueles que são mantidos na cauda do epidídimo (in vivo) permanecem vivos por mais de 15 dias. Esta funcionalidade é baseada na manutenção do metabolismo com baixa atividade, prevenindo a ativação prematura dos espermatozóides. Durante o período de armazenamento o epidídimo acumula espermatozóides suficientes para a cópula. O volume da cauda do epidídimo reflete a capacidade de armazenamento de espermatozóides do macho (Bedford, 1994).

Pesquisas têm demonstrado que espermatozóides epididimais podem ser usados na inseminação artificial, fertilização “*in vitro*” e injeção intracitoplasmática de espermatozóides com resultados satisfatórios (James et. al., 2002).

Na cabeça e corpo do epidídimo ocorrem processos de concentração, retirada de gota protoplasmática proximal e inicia-se a capacidade motora do espermatozóide. Já na cauda ocorrem os processos de alteração do pH e osmolaridade, secreção de anti-aglutininas e gliceril-fosforil-colina, além do armazenamento dos espermatozóides. De 45 a 70% dos espermatozóides produzidos diariamente na cauda do epidídimo permanecem até a ejaculação, sendo esta reserva espermática potencialmente fértil. A recuperação de espermatozóides do epidídimo é atualmente uma importante técnica para obtenção de reserva de germoplasma provenientes de animais com alta importância genética e/ou afetiva (Brito et. al., 2008).

Os espermatozóides ao saírem do epidídimo, recebem as secreções das glândulas anexas, o plasma seminal, constituído por aminoácidos, íons e proteínas, que os habilitam para a capacitação, ligação a zona pelúcida e reação acrossômica (Maxwell & Johnson, 1999).

As proteínas que induzem a motilidade progressiva fazem parte do grupo FMP (proteínas da motilidade progressiva), constituído-se de quatro a cinco proteínas agregadas entre si, de baixa massa molecular (37,5 kDa), e cuja atuação, juntamente com cAMP, íons de Ca²⁺ e pH, desencadeia a atividade flagelar. No entanto, varias proteínas do plasma seminal têm papel inibidor da motilidade como

as SMIF (fatores de inibição de motilidade do sêmen). Estas proteínas diminuem a velocidade dos espermatozóides pela inibição da dineína intertubular do flagelo, sem, no entanto, afetar a linearidade (Silva et al., 2003).

Embora as proteínas contidas no plasma seminal exerçam papel importante na funcionalidade dos espermatozóides, existe a hipótese de que o plasma não seja totalmente essencial à fertilização, ou até mesmo danifica os espermatozóides (Silva et al., 2003).

Segundo Barrios et al. (2000), O plasma seminal contém uma variedade de componentes bioquímicos, alguns dos quais são relativamente específicos para a regulação da função dos espermatozóides. Estudos sobre várias espécies sugerem que o plasma seminal contém fatores que podem influenciar a viabilidade espermática.

De acordo com Silva et al., (2006), o plasma seminal causa um efeito deletério na viabilidade dos espermatozóides de caprinos quando criopreservados com diluente contendo gema de ovo e/ou leite desnatado. Uma das explicações seriam a síntese e secreções de enzimas pelas glândulas bulbo-uretrais liberadas no plasma, as quais podem se associar aos componentes destes diluentes e produzir componentes tóxicos para a célula espermática.

Muitos métodos de recuperação são descritos e variam dependendo do autor e da espécie animal. Nos animais de companhia, devido ao tamanho do epidídimo, o método de preferência é o fatiamento que consiste em cortar ou fatiar a cauda do epidídimo e deixar repousar em um meio diluidor, desta maneira, os espermatozóides migram para o meio e são recuperados através de filtração (Mota Filho & Silva, 2012).

Kaabi et al., (2003), descreve uma técnica similar que consiste em fazer numerosos cortes na cauda do epidídimo e pressionar suavemente a cauda e coletar os espermatozóides por extravasamento do líquido epididimário.

Outro método consiste em promover um fluxo retrógrado na cauda do epidídimo aplicando pressão aos vasos deferentes até que o conteúdo da cauda saia através de um corte feito na junção com o corpo do epidídimo. A pressão é gerada com uma seringa, que injeta ar ou algum diluente inócuo aos espermatozóides (Mota Filho & Silva, 2012).

Segundo Martinez-Pastor et. al. (2006), a colheita de espermatozoides da cauda do epididimo através do fluxo retrógrado é a técnica mais indicada, pois as amostras obtidas apresentam um menor nível de contaminação e são de melhor qualidade em relação aos outros métodos.

O estudo do uso de espermatozoides viáveis recuperados do epididimo de carnívoros após a morte, pode ser mensurado através do uso de espermatozoides obtidos do epididimo de cães domésticos após a castração, para definição de protocolos de reprodução assistida em carnívoros selvagens, objetivando avaliar a viabilidade dos espermatozoides do epididimo nas condições climáticas de nosso estado, simulando a morte de canídeos vítimas de atropelamento nas rodovias.

3 REFERÊNCIAS

- Azevedo M. H. F., Paula T. A. R., Matta S. L. P. , Fonseca C. C., Neves M. T. D. Morfometria testicular e o túbulo seminífero da onça-pintada (*Panthera onca*) adulta; 2006 [acesso em maio/jun. 2012]. Disponível em : <http://www.ceres.ufv.br/CERES/revistas/V53N307P05306.pd>.
- Barrios, Pérez-Pé R, Gallego M. Tato A, Osada J, Blanco et al. Seminal Plasma Proteins Revert the Cold-Shock Damage on Ram Sperm Membran Biology of reproduction. [acesso em jul 2012] Disponível em: <http://www.biolreprod.org/content/63/5/1531.long>.
- Bedford, J.M. The status and the state of the human epididymis. *Human Reproduction*. 1994; 9:2187-2199.
- Bedford. JM. Center for Reproductive Medicine and Infertility. Department of Obstetrics and Gynecology, and Department of Cell Biology and Anatomy, Cornell University Medical College. New York, USA; 1994.
- Benoit, J.. 1926, Recherches anatomiques, cytologiques e histophysiologiques sur les voies excrétrices du testicule chez les mammiferes. *Arch. Anat. Histol. Embryol. (Strasb)*. 5, 173-412.
- Bissett C., Bernard R.T.F. The effect of prolonged cold storage of eland (*Taurotragus oryx*) cauda epididymides on the spermatozoa: possible implications for the conservation of biodiversity . June 2004; [Acesso em ago 2012]. Disponível em www.journals.elsevierhealth.com/periodicals/the
- Borges E., Braga D. P. A. F., Bonetti T. C. S., Jr M.D. A J, Franco J. G.. Artificial oocyte activation with calcium ionophore A23187 in intracytoplasmic sperm injection cycles using surgically retrieved spermatozoa. *Fertility and Sterility*. July 2009; 92(1):
- Brito, M. F.; Gontijo, A. O.; Melo, M. I. V. Avaliação Comparativa de Duas Técnicas para Coleta de Espermatozóide Epididimário Bovino Post Mortem. 2008.

- Brugnon F., M.D. L. J., M.D C. A., Pouly, J. L., Grizard G., Ph.D. Activated caspases in thawed epididymal and testicular spermatozoa of patients with congenital bilateral absence of the vas deferens and intracytoplasmic sperm injection outcome. August 2009; v. 92 (2) [acesso em 20 set 2012] disponível em <http://www.crh.com.br/51.pdf>
- CADEITA B. C. Avaliação morfofuncional do testículo e do processo espermatogênico do cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*, Linnaeus, 1766) adulto. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa: Minas Gerais. 2007.
- Cassella, J.; Cáceres, N.C.; Goulart, C.S.; Paranhos Filho, A.C. Uso do sensoriamento remoto e análise espacial na interpretação de atropelamentos de fauna entre Campo Grande e Aquidauana, MS. Anais do Simpósio De Geotecnologias No Pantanal, 1. 2006: 321-326 Campo Grande.
- Corout, M, Hochereau-de-Reviere, M. T, Ortavant, R. Spermatogenesis. In: Johnson, A.D, Gomes, W.R, Vandemark, N.L.. The testis. New York: Academic Press. 1970. p. 339-432,
- Corson WH. Manual global de ecologia. 2.ed. São Paulo: Augustus Editora, 1996. 413p.
- Costa DS, Henry M, Paula, TAR. Espermatogênese de catetos (*Tayassu tajacu*). Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 2004; 56 (1): 46-51.
- Deem S. L., D.V.M., Ph.D., Dipl. A.C.Z.M., and Louise H. Emmons, Ph.D. Exposure of free-ranging maned wolves (*chrysocyonbrachyurus*) to infectious and parasitic diseaseagents in the Noel Kempff Mercado National Park, Bolivia. Journal of Zoo and Wildlife Medicine. 2005; 36(2): 192-197.
- Fowler, M.E. Biology, medicine, and surgery of South American wild animals. Ames: Iowa State University Press; 2001. 536p. [acesso em 15 set/out 2012]. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470376980.app1/summary>.
- James, A.N.; Green, H.; Hoffman, S.; Landry, A.M.; Paccamonti, D.; Godke, R.A. Preservation of equine sperm stored in the epididymis at 4 °C for 24, 48, 72 and 96 hours. Theriogenology, 2002; v.58, p.401-404.
- Johnson L. Spermatogenesis. In: CUPPS, P.T. Reproduction in domestic animal, 4^o ed. New York: Academic Press. 1991. p. 173-219.

- Junqueira, L.C., Carneiro. J. Aparelho Reprodutor Masculino. In: Junqueira L.C., Carneiro. J. Histologia básica. 11 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 2005. p. 323-334.
- Keeley T., McGreevy P.D, O'Brien J.K. Characterization and short-term storage of Tasmanian devil sperm collected post-mortem. mar/abr 2011; [Acesso em jun 2012]. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X11001610>
- Martinez-Pastor, F.; Macias, V.G.; Alvarez, M.; Chamorro, C.; Herraiez, P.; Paz, P.; Anel, L. Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer. 2006; v.65, p.471-485.
- Martucci M. F., Mançaneres C. A., Ambrósio E. C., Franciulli A. L. R., Miglino M. A., Rosa R. A., Carvalho A. F. Estudo morfológico dos órgãos genitais masculinos do guaxinim (*Procyon cancrivorus*). Pesq. Vet. Bras. nov. 2011; 31(11):1024-1030.
- Maxwell W.M.C, Johnson L.A. Physiology Of Spermatozoa At High Dilution Rates: The Influence Of Seminal Plasma. August 1999. [Acesso em out 2012] Disponível em: <http://naldc.nal.usda.gov/download/34158/PDF>.
- Miya P.S., Soler T.B., Correa S.H.R., Guimarães M.A.B.V.. Avaliação do espermograma de leões africanos (*Panthera Leo, Linnaeus, 1758*), mantidos na Fundação Parque Zoológico de São Paulo. Brazilian Journal of veterinary research and animal science. V. 44 supl. São Paulo 2007.
- Mota Filho A. C, Silva L. D. M. Recuperação e conservação de espermatozoides epididimários de mamíferos. Acta Veterinaria Brasilica. 2012; 6 (1):1-8
- Muradás, P.R., Weiss, R.R., Kozicki, L.E., Granemann, L.C., Santos, I.W., Pimpão, C.T. Alguns Parâmetros de Viabilidade de Espermatozóides Equínos Colhidos por Vagina Artificial e por Lavagem da Cauda do Epidídimo (Some viability parameters from equine spermatozoa harvested by artificial vagina and by epididymal tail washing); 2006; v. 11 (3):p.69-74 [acesso em 15 ago 2012] disponível em: <http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs-2.2.4/index.php/veterinary/article/viewFile/7420/5326>.
- Novais A. A., Fagliari J. J, Santana A. E. Valores sangüíneos de referência e investigações sobre a presença de antígenos eritrocitários caninos (dea – dog erythrocyte antigen) em lobos-guarás (*Chrysocyon brachyurus*) e cachorros-do-

- mato (*Cerdocyon thous*). [acesso em março 2012]. Disponível em: <http://www.seer.ufu.br/index.php/vetnot>.
- Paula, TRA. Reprodução de carnívoros silvestres. XIX Congresso Brasileiro de Reprodução Animal; 2011; Recife, 25 a 27 de maio de 2011.
- Paz R. C. R., Valquíria R. M. H. B., Morato R. G, Felipe A. N., Barnabe R. C.. Avaliação da capacidade de penetração de sêmen congelado de onça pintada (*Panthera onca*) em oócitos heterólogos. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. dez. 2000; 37(6).
- Prado R. T., Ferreira A., Guimarães A., Faria Z. Efeito da implantação de rodovias no cerrado brasileiro sobre a fauna de vertebrados. Acta Scientiarum . Biological Sciences. Jul.-set.2006; 28 (3):237-241.
- Projeto conviver gente & onças, (acesso em janeiro de 2013). Disponível em: <http://www.jaguarnetwork.org>.
- Robaire B., Hinton B. T., Orgebin-Crist M-C. KNOBIL AND NEILL'S PHYSIOLOGY OF REPRODUCTION. 3 ed. By Jimmy D. Neill, Elsevier, 2006. Cap. 22, p. 1073.
- Rodriguez, C.M.; Kirby, J.L.; Hinton, B.T. Regulation of gene transcription in the epididymis. Reproduction. 2001; 122: 41-48.
- Silva A. E. D. F., Freitas A. R., Unanian M. M., Junior C. B., Dias A. L. Conteúdo de Peptídeos e Avaliação Morfofisiológica dos Espermatozoides do Epidídimo e Ejaculado de Bovinos. R. Bras. Zootec. 2003; 32 (6): 1890-1900.
- Silva J. C. R., Siqueira D. B., Marvulo M. F. V. Ética e bem-estar em animais silvestres: animais de conservação. Ciênc. Vet. Tróp., Recife-PE. abr. 2008; 11(supl. 1):61-65.
- Soares J. M., Benetti M. E., Machado E. R., Silva M., Biosci. J., Histomorfometria de testículos de gatos (*Felis domestica*) utilizando-se três diferentes fixadores Biosci. J., Uberlândia. Jan./abr 2006; 22(1): 175-181.
- Tedford, R.H., Taylor, B.E., Wang, X. Phylogeny of the caninae (Carnivora:Canidae): the living taxa. American Museum Novitates, New York. 1995; (3146): 1-37.
- Tsutsui T., Wada M., Anzai M & Hori T. Artificial insemination with frozen epididymal sperm in cats. Journal of Veterinary Medical Science. 2003; 65(3):397-399.
- Vieira, D.K., Suzano, S.M., Silveira, A.M., Pires, M. V., Libonati, J., Ferreira, A.M.R. Avaliação Clínica, Citológica e Seminal de Gatos Domésticos (*Felis Catus*) Para

- seleção de Reprodutores. (acesso em janeiro de 2013). Disponível em: <http://www.castelobranco.br/sistema/novoenfoco/webroot/files/09/resumo/02.pdf>.
- Villaverde, A. I. S. B., Lopes, M. D. Inseminação artificial em gatos domésticos utilizando sêmen criopreservado. Rev Bras Reprod Anim, Belo Horizonte, v. 31, n.1, p.77-83, jan./mar. 2007. (acesso em janeiro de 2013). Disponível em: <http://www.cbra.org.br>.
- Wildt, D.E. Strategies for the practical application of reproductive Technologies to endangered species. Zoo Biology Supplement. 1989; 1:17-20.

4 CAPÍTULO I

AVALIAÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES RECUPERADOS DO EPIDÍDIMO DE CÃES ADULTOS EM DIFERENTES TEMPOS APÓS ORQUIECTOMIA

EVALUATION OF EPIDIDYMAL SPERMATOOZA RECOVERED FROM ADULT DOGS AT DIFFERENT TIMES AFTER ORCHIECTOMY

Ediane Oliveira de Amorim^{1*}, Flaviana Lima Guião Leite²

ABSTRACT. Currently the conservation of wild animals living free is influenced by several factors. In the case of populations of carnivores, we can cite as aspects that negatively pressuring the destruction and fragmentation of their habitats, and hunting, as well as their prey, by man. The collection technique epididymis sperm may be the last chance to ensure the preservation of genetic material from injury or death of the animal. The aim of this study was to evaluate the viability of spermatozoa in the epididymis climate of our state, Espírito Santo, Brazil, simulating death of canids victims of trampling on the highways of the state. Testes were collected from dogs of sterilization campaigns organized by the staff of the Veterinary Hospital of the University Rippler Alexandre Ricardo Vila Velha-ES, as well as elective procedures performed at the same hospital. 21 dogs were used aged 1 to 10 years of various races, healthy, non cryptorchid, totaling 42 epididymis was performed in the recovery of spermatozoa room temperature using the method of slicing the epididymis, for 7 hours, at intervals of one hours to 7 hours using three different dogs in each time interval. As expected, there was a decline in sperm quality with increasing time after orchiectomy. Sperm collected from the tail of the epididymis and kept were considered viable room temperature for 7 hours after orchiectomy. Motilidde total and progressive motility of spermatozoa remained satisfactory even after 7 hours apart, characterized sperm viability acceptable. With the results obtained in this research, other projects can be performed using analytical methods and complementary techniques such as: assessing dye for analysis of vitality, cool a testicle and another to maintain temperature and morphological analysis of sperm, confirming previous results.

KEY WORDS: conservation, wildlife, reproduction, epididymis.

¹ Médica Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Vila Velha-ES (UVV), Rua Sesquicentenário, n. 5, Nova Itaparica, Vila Velha-ES, Cep.29.104-050, Brasil. E-mail: edianeoliveiraamorim@yahoo.com.br.

² Médica Veterinária, Profa. Dra. do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Vila Velha-ES (UVV), E-mail: flaviana.lima@uvv.br .

RESUMO. Atualmente a conservação de animais selvagens de vida livre é influenciada por diversos fatores. No caso das populações de carnívoros, podemos citar como aspectos que as pressionam de maneira negativa a destruição e fragmentação de seus habitats, e sua caça, assim como a de suas presas, pelo homem. A técnica de coleta de espermatozoides epididimais pode ser a última chance para assegurar a preservação do material genético após lesão ou morte do animal. O objetivo desse estudo foi avaliar a viabilidade dos espermatozoides do epidídimo nas condições climáticas de nosso estado, Espírito Santo, Brasil, simulando a morte de canídeos vítimas de atropelamento nas rodovias do estado. Foram coletados testículos de cães provenientes das campanhas de esterilização organizadas pela equipe do Hospital Veterinário Ricardo Alexandre Rippler da Universidade Vila Velha-ES, bem como os procedimentos eletivos efetuados no mesmo hospital. Foram utilizados 21 cães com idade entre 1 e 10 anos de várias raças, hípidos, não criptorquídicos, totalizando 42 epidídimos, foi realizada a recuperação dos espermatozoides em temperatura ambiente, utilizando o método de fatiamento do epidídimo, por 7 horas, em intervalos de uma hora a 7 horas utilizando 3 cães diferentes em cada hora de intervalo. Como esperado, observou-se um declínio da qualidade espermática com o aumento do tempo pós-orquiectomia. Os espermatozoides colhidos da cauda de epidídimos e mantidos à temperatura ambiente foram considerados viáveis por 7 horas pós-orquiectomia. Motilidade total e motilidade progressiva dos espermatozoides se manteve satisfatória mesmo após 7 horas de intervalo, caracterizando viabilidade espermática aceitável. Com os resultados obtidos nessa pesquisa, outros projetos podem ser realizados utilizando métodos de análise e técnicas complementares como: avaliar com corante para análise de vitalidade, resfriar um testículo e manter outro em temperatura ambiente e análise morfológica dos espermatozoides, corroborando com resultados anteriores.

PALAVRAS CHAVE: conservação, espermatozoides, epidídimo, animais selvagens.

INTRODUÇÃO

Atualmente a conservação de animais selvagens de vida livre é influenciada por diversos fatores. No caso das populações de carnívoros, podemos citar como aspectos que as pressionam de maneira negativa a destruição e fragmentação de seus habitats, e sua caça, assim como a de suas presas, pelo homem (Deem et. al., 2005).

Os programas de reprodução em cativeiro, os bancos de recursos genéticos e as técnicas de reprodução assistida tem sido sugeridos como importantes, incluindo para os carnívoros neotropicais (Sadalla Filho 2004).

Os representantes atuais da família Canidae são tradicionalmente agrupados em três subfamílias: subfamília *Canidae*, com os gêneros *Canis Alopex*, *Vulpes*, *Fennecus*, *Urocyon*, *Nyctereutes*, *Dusicyon*, *Cerdocyon*, *Atelocynus* e *Chrysocyon*; subfamília *Simocyoninae*, com os gêneros *Speothos*, *Cuon* e *Lycaon*; subfamília *Otocyoninae*, com o gênero *Otocyon* (Fowler, 2001).

Uma grande dificuldade encontrada pelos pesquisadores que trabalham com animais silvestres reside nas restrições de acesso aos espécimes de vida livre e cativeiro, fazendo com que o número reduzido de indivíduos dificulte a obtenção de informações estatisticamente significativas. O estudo de aspectos básicos da reprodução é importante para fornecer informações que auxiliem no desenvolvimento de tecnologias em reprodução assistida (Wildt, 1989).

Por serem topo de cadeia alimentar, os carnívoros, de modo geral, são utilizados como animais bandeira para conservação das demais espécies, ou seja, os projetos de conservação, em especial in situ, que envolvam estes, animais, têm uma abrangência multiplicada em vista da área necessária para caça e refúgio. Neste sentido, são mais abundantes estudos em reprodução assistida em felinos que qualquer outro grupo silvestre. Também inúmeros trabalhos são desenvolvidos em carnívoros domésticos visando a utilização destes como modelos experimentais para aplicação em animais silvestres (Paula, 2011).

Registros de Aristóteles, portanto, anteriores a 300 AC, relataram a utilização da castração como método de estudo da biologia reprodutiva (Johnson, 1991).

A técnica de coleta de espermatozóides epididimais pode ser a última chance para assegurar a preservação do material genético após lesão ou morte do animal. Nos mamíferos, o epidídimo possuiu diversas funções, ressaltando-se reabsorção dos fluídos dos túbulos seminíferos, promovendo a concentração do sêmen, o transporte dos espermatozóides, a eliminação dos espermatozóides defeituosos, a maturação e o armazenamento dos espermatozóides (Bedford, 1994).

Segundo Borges et. al. (2009), os espermatozóides do epidídimo fornecem embriões de melhor qualidade, quando comparados com embriões derivados de espermatozóides testicular.

Estudos sobre várias espécies sugerem que o plasma seminal contém fatores que podem influenciar a viabilidade espermática (Barrios et. al., 2000).

Um estudo morfológico apresentado por Tedford et al. (1995) indica que o lobo-guará, o cachorro-do-mato e o cão doméstico derivem de um ancestral semelhante ao lobo, e apresenta uma árvore filogenética em concordância com os estudos cariotípicos e biomoleculares. Ou seja, que essas três espécies constituem um grupo monofilético e possuem o mesmo padrão de ramificação evolutiva (Novais et al., 2005).

Neste sentido o estudo do uso de espermatozóides viáveis recuperados do epidídimo após a morte, pode ser mensurado através do uso de espermatozóides obtidos do epidídimo de cães domésticos após a castração, para definição de protocolos de reprodução assistida em carnívoros selvagens.

O objetivo desse estudo foi avaliar a viabilidade dos espermatozóides do epidídimo nas condições climáticas de nosso estado, Espírito Santo, Brasil, simulando a morte de animais vítimas de atropelamento nas rodovias do estado.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletados testículos de cães provenientes das campanhas de esterilização organizadas pela equipe do Hospital Veterinário Ricardo Alexandre Rippler da Universidade Vila Velha-ES, bem como os procedimentos eletivos efetuados no mesmo hospital. Foram utilizados 21 cães com idade entre 1 e 10 anos de várias raças, hígdos, não criptorquídicos, totalizando 42 epidídimos, foi realizada a recuperação dos espermatozóides em temperatura ambiente por 7 horas, em intervalos de uma hora a 7 horas utilizando 3 cães diferentes em cada hora de

intervalo. Os animais foram anestesiados conforme os protocolos da equipe de anestesistas. Para facilitar o procedimento de lavagem dos epidídimos, os mesmos foram encaminhados juntamente com o cordão espermático, os conjuntos de testículos e epidídimos foram lavados externamente com solução de Ringer com Lactato e acondicionados em sacos plásticos imersos em solução de Ringer com Lactato, em seguida os epidídimos foram separados dos testículos, sendo isolado a cauda do epidídimo e o ducto deferente. Os espermatozóides foram obtidos através do método de fatiamento, que consiste em cortar ou fatiar a cauda do epidídimo e deixar repousar em um meio diluidor, desta maneira, os espermatozóides migram para o meio e são recuperados através de filtração, como descrito por Mota Filho & Silva, 2012. O meio diluidor utilizado foi FG veterinária diluente para sêmen eqüino, e a recuperação feita por meio de sucção utilizando seringa de 3 ml. Imediatamente após a coleta foi feita a avaliação da motilidade e motilidade progressiva, essas análises foram realizadas em microscopia óptica, em aumento de 200 vezes, escala de 0 a 5, entre os valores mínimos e máximos observados, respectivamente segundo critérios propostos pelo Colégio Brasileiro de Reprodução.

A mesma análise foi repetida com intervalo de 1 hora até atingir 7 horas de intervalo. Os dados foram anotados em tabela no excel, a metodologia estatística utilizada para análise dos dados foi matemática de porcentagem simples.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação padrão do sêmen é, primariamente, baseada em parâmetros físicos.

A avaliação da motilidade espermática é o parâmetro mais utilizado para a avaliação do sêmen, definida como a porcentagem de espermatozóides móveis da amostra avaliada imediatamente após a colheita. A proporção de espermatozóides exibindo motilidade progressiva é, geralmente, estimada, subjetivamente, no microscópio óptico de contraste de fase. Para tanto, faz-se uso de uma escala compreendida numa faixa de 0 a 5. (Cardoso et. al., 2005). Como demonstra a TABELA 1. A tabela demonstra que estes animais apresentam viabilidade aceitável até 7 horas pós colheita.

Tabela 1 – Comparação das Médias de Motilidade Total, Motilidade Progressiva dos Espermatozóides Recuperados da Cauda do Epidídimo Com Intervalos de 1 Até 7 Horas.

NÚMERO DE ANIMAIS	HORAS PÓS-INICÍO DAS ANÁLISES	MOTILIDADE TOTAL MÉDIA (%)	MOTILIDADE PROGRESSIVA MÉDIA (%)
3	1	85,0	72,2
3	2	71,7	60,0
3	3	80,0	65,0
3	4	68,3	168,3
3	5	33,3	8,3
3	6	28,9	16,7
3	7	46,7	66,7

Como esperado, observou-se um declínio da qualidade espermática com o aumento do tempo pós-orquiectomia (Gráfico 1), (Gráfico 2). Este decréscimo não é devido somente ao envelhecimento e esgotamento metabólico dos espermatozóides, mas também é inerente ao processo de degeneração tecidual pós-orquiectomia.

Pesquisadores ao trabalharem com outras espécies animais, como Soler et. al 2003 com cervus e Kishikawa et al. (1999) em ratos, Muradás 2006 em equinos, demonstraram que espermatozóides epididimários viáveis podem ser recuperados de epidídimos armazenados à temperatura ambiente por até 24 horas, corroborando os valores encontrados no presente experimento.

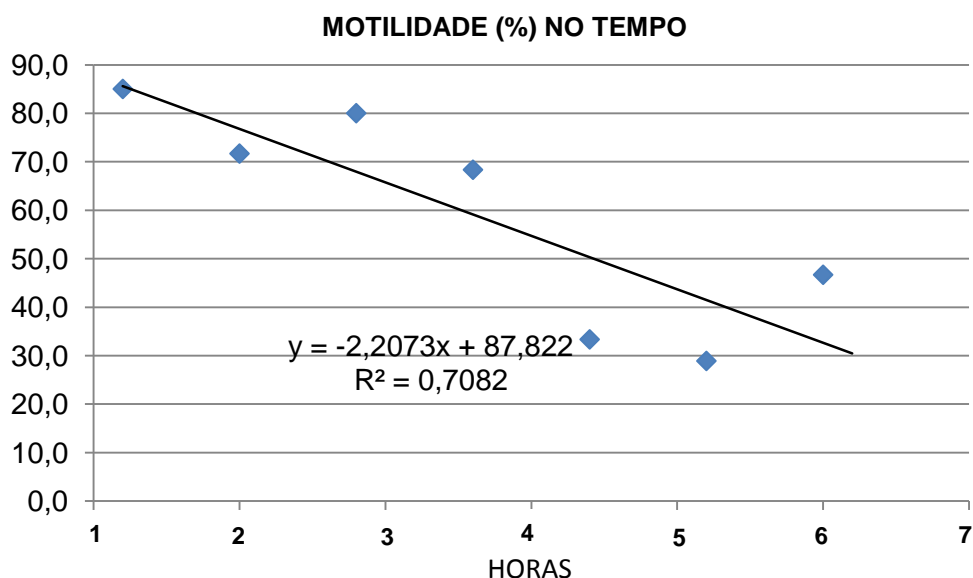


Gráfico 1 - Relação do Percentual de Motilidade Total dos Espermatozóides Colhidos da Cauda do Epidídimo à Temperatura Ambiente e as Horas Pós-Orquiectomia (2012).

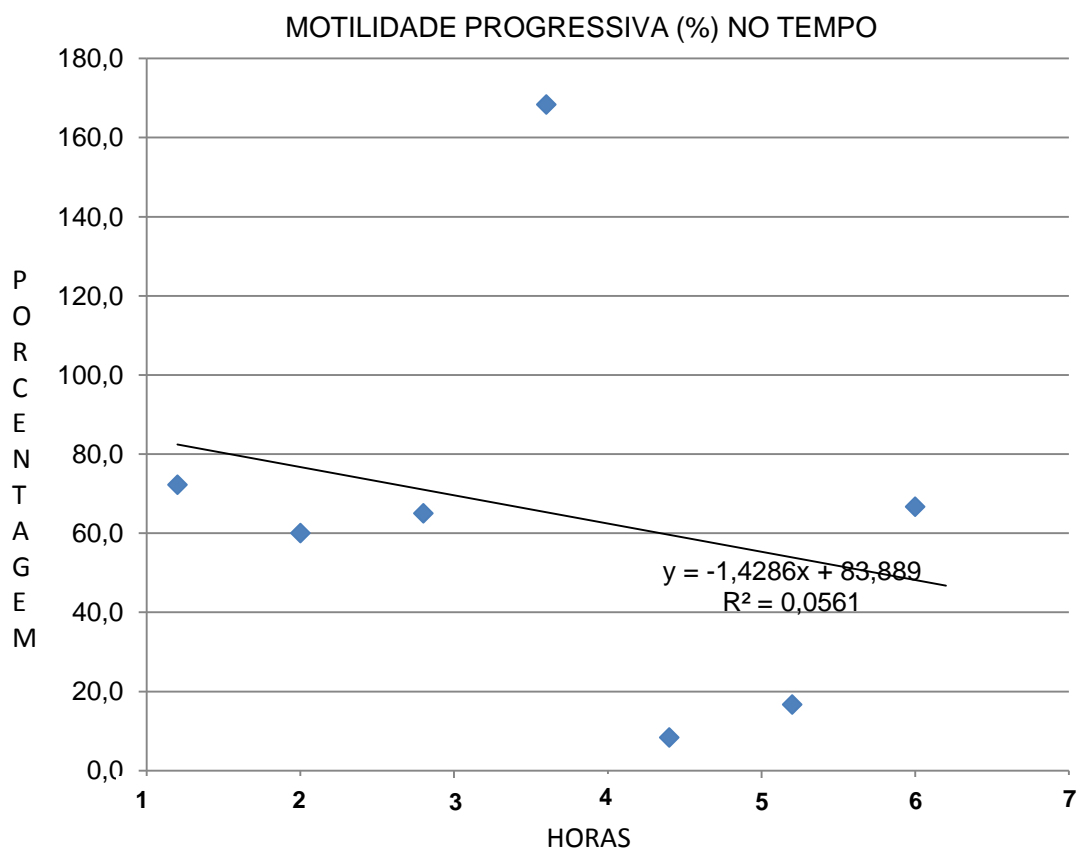


Gráfico 2 - Relação do Percentual de Motilidade Progressiva dos Espermatozóides Colhidos da Cauda do Epidídimo à Temperatura Ambiente e as Horas Pós-Orquiectomia (2012).

O intervalo de 7 horas para a colheita de espermatozóides de epidídimos armazenados à temperatura ambiente com motilidade verificado nesse experimento, é bastante inferior ao encontrado por James et al. (2002) em garanhões, Garde et al. (1998) em cervídeos e Yu e Leibo (2002) em cães, ao recuperarem espermatozóides epididimários viáveis por até 96 horas pós-orquiectomia. Estes valores são muito superiores aos encontrados no presente experimento, porque eles mantiveram os epidídimos refrigerados a 5°C após a orquiectomia. A temperatura mais baixa retarda o processo de degeneração e reduz o metabolismo dos espermatozóides mantendo-os vivos por mais tempo (James et al., 2002).

O que justifica o tempo superior de viabilidade dos espermatozóides, nossa abordagem foi testar a viabilidade numa situação completamente adversa, para desenvolver um protocolo de coleta viável e assim avaliar a viabilidade de

espermatozoides do epidídimo simulando a coleta após a morte de canídeos nas condições climáticas do Espírito Santo, Brasil.

CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos nesse experimento conclui-se que:

a) Os espermatozoides colhidos da cauda de epidídimos e mantidos à temperatura ambiente foram considerados viáveis por 7 horas pós-orquiectomia.

b) Motilidade total e motilidade progressiva dos espermatozoides se manteve satisfatória mesmo após 7 horas de intervalo, caracterizando viabilidade espermática aceitável.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Cardoso R.C.S., Silva A. R., Silva D. M. Métodos de avaliação do sêmen canino congelado (*Methods to evaluate frozen canine semen*). Rev Bras Reprod Anim. 2005 jul-dez; 29 (3/4): 179-187.

Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal; 2 ed. Belo Horizonte; 1998:49.

Deem S. L., D.V.M., Ph.D., Dipl. A.C.Z.M., and Louise H. Emmons, Ph.D. Exposure of free-ranging maned wolves (*chrysocyonbrachyurus*) to infectious and parasitic diseaseagents in the Noel Kempff Mercadonational park, Bolivia. Journal of Zoo and Wildlife Medicine. 2005; 36(2): 192-197.

Fowler, M.E. Biology, medicine, and surgery of South American wild animals. Ames: Iowa State University Press; 2001: 536.

Gard J.J., Soler A. J., Pérez-guzmán M.D. Storage of red deer epididymides for four days at 5°C: Effects on sperm motility, viability, and morphological integrity; 2003 [acesso em 20 jul 2012] disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jez.a.10194/abstract>.

Garde, J.; Ortiz, N.; Garcia, A.; Gallego, L.; LandeTE, C.T.; Lopez, A. Post-mortem assessment of sperm characteristics of the red deer during the breeding season. Archives of Andrology, 1998; v.41, p.195-202 [acesso em 01 jul 2012] disponível em: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/01485019808994891>.

- James, A.N.; Green, H.; Hoffman, S.; Landry, A.M.; Paccamonti, D.; Godke, R.A. Preservation of equine sperm stored in the epididymis at 4 °C for 24, 48, 72 and 96 hours. *Theriogenology*, 2002; v.58, p.401-404.
- Johnson L. Spermatogenesis. In: CUPPS, P.T. *Reproduction in domestic animal*, 4^o ed. New York: Academic Press. 1991. p. 173-219.
- Kishikawa, H.; Tateno, H.; Yanagimachi, R. Fertility of mouse spermatozoa retrieved from cadavers and maintained at 4°C. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.116, p.217-222, 1999.
- Muradás, P.R., Weiss, R.R., Kozicki, L.E., Granemann, L.C., Santos, I.W., Pimpão, C.T. Alguns Parâmetros de Viabilidade de Espermatozoides Equínos Colhidos por Vagina Artificial e por Lavagem da Cauda do Epidídimo (Some viability parameters from equine spermatozoa harvested by artificial vagina and by epididymal tail washing); 2006; v. 11 (3):p.69-74 [acesso em 15 ago 2012] disponível em: <http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs-2.2.4/index.php/veterinary/article/viewFile/7420/5326>.
- Paula, TRA. Reprodução de carnívoros silvestres. XIX Congresso Brasileiro de Reprodução Animal; 2011; Recife, 25 a 27 de maio de 2011.
- Tedford, R.H., Taylor, B.E., Wang, X. Phylogeny of the caninae (Carnivora:Canidae): the living taxa. *American Museum Novitates*, New York. 1995; (3146): 1-37.
- Wildt, D.E. Strategies for the practical application of reproductive Technologies to endangered species. *Zoo Biology Supplement*. 1989; 1:17-20.
- Yu, I.; Leibo, S. Recovery of motile, membrane-intact spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4 °C. *Theriogenology*, 2002; v.57, p.1179-1190. [acesso em 15 set 2012] disponível em: [http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X\(01\)00711-7/abstract](http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X(01)00711-7/abstract).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com os resultados obtidos nessa pesquisa, outros projetos podem ser realizados utilizando métodos de análise e técnicas complementares como: avaliar com corante para análise de vitalidade, resfriar um testículo e manter outro em temperatura ambiente e análise morfológica dos espermatozoides, complementando com resultados anteriores.