

AVALIAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMÁRIOS DE GATOS DOMÉSTICOS APÓS RECUPERAÇÃO COM ACP-117C OU TRIS, ADIÇÃO DE GEMA E REFRIGERAÇÃO A 4 °C POR 24h

(Epididymal sperm evaluation of domestic cats after recovery with ACP-117c or Tris egg yolk addition and cooling at 4 °C for 24h)

David Baruc Cruvinel LIMA^{1*}, Ticiana Franco Pereira da SILVA¹, Annice Aquino-CORTEZ¹, José Nicodemos PINTO¹, Bianca Nunes CALDINI¹, Francisco Felipe de MAGALHÃES¹, Lúcia Daniel Machado da SILVA¹

¹Laboratório de Reprodução de Carnívoros, Faculdade de Veterinária - Universidade Estadual do Ceará (UECE) - Fortaleza, CE.

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi avaliar a qualidade de espermatozoides recuperados do epidídimo de gatos domésticos utilizando os diluidores ACP-117c ou Tris adicionados de gema de ovo e refrigerados por 24h. Foram utilizados quatro gatos. Os animais foram submetidos à orquiectomia bilateral, obtendo-se os complexos testículo-epidídimo (CTE). Os CTE foram acondicionados em solução fisiológica a 0,9% e refrigerados a 4 °C durante 2h. Em seguida, os espermatozoides foram recuperados com ACP-117c ou Tris e avaliados quanto à motilidade e ao vigor. Posteriormente, 80µl da diluição foram acondicionados em um microtubo de 1,5mL juntamente com 20µl de gema de ovo e as células reavaliadas. Logo após, uma alíquota foi armazenada sob refrigeração a 4 °C por 24h e então novamente avaliada. A motilidade total e o vigor espermático utilizando o diluidor ACP-117c foram significativamente inferiores no grupo refrigerado por 24h quando comparados ao grupo fresco. A motilidade e o vigor declinaram no grupo refrigerado com o Tris por 24h em comparação aos outros grupos. A motilidade com o Tris foi superior à motilidade com o ACP-117c após 24h de refrigeração. As células espermáticas epididimárias de gatos domésticos conseguem manter os parâmetros de motilidade e vigor necessários para posterior utilização após adição da gema de ovo, entretanto, no período pós-refrigeração devem ser desenvolvidos novos estudos com ACP-117c com vistas a melhores resultados.

Palavras-chave: Epidídimo, Gato, Gema de ovo, Refrigeração

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the quality of spermatozoa recovered from domestic cats epididymis using the ACP-117c or Tris extenders added by egg yolk and cooled for 24h. Four cats were used. The animals were submitted to bilateral orchietomy, obtaining the testis epididymis complexes (TEC). The TEC were stored in 0.9% saline solution and cooled at 4 °C for 2h. Then the spermatozoa were recovered with ACP-117c or Tris and evaluated for motility and vigor. Subsequently, 80µl of the dilution were placed in a 1.5 mL micro tube together with 20µl of egg yolk and the cells were reassessed. Soon after, an aliquot was stored in a refrigerator at 4 °C for 24 hours and then reassessed. The total motility and sperm vigor using the ACP-117c extender were significantly lower in the group refrigerated for 24h when compared to the fresh group. The motility and vigor declined in the refrigerated group with Tris for 24h as compared to other groups. The motility with Tris was higher than the motility with ACP-117c after 24h of cooling. The epididymal spermatic cells of domestic cats can maintain motility parameters and vigor required for further use after addition of egg yolk, however, further studies should be developed with ACP-117c in the post-cooling time in order to obtain better results.

Keywords: Epididymis, Cat, Egg yolk, Cooling

* Endereço para correspondência:
E-mail: davidbarucvet@gmail.com

INTRODUÇÃO

A refrigeração de gametas é uma prática valiosa nos programas de reprodução assistida, permitindo o armazenamento de espermatozoides para posterior fecundação *in vitro* ou inseminação artificial. Nesta perspectiva, a utilização de espermatozoides epididimários é considerada uma alternativa para manutenção do material genético de espécies ameaçadas de extinção, como em diversas espécies felinas, e procedimentos realizados com gatos domésticos podem auxiliar no desenvolvimento de técnicas voltadas aos felídeos selvagens (Cocchia et al., 2009).

O processo de refrigeração promove a diminuição do metabolismo dos espermatozoides, prolongando a viabilidade e capacidade fertilizante dessas células, entretanto, o tempo de refrigeração interfere na qualidade seminal. Assim, apesar dos avanços neste campo da pesquisa, a criopreservação celular ocasionada nos processos de preservação das células espermáticas a baixas temperaturas ainda apresenta-se como um obstáculo à área da reprodução (Cardoso et al., 2010; Gosden, 2011).

A utilização de diluidores seminais possibilita um ambiente favorável à sobrevivência dos espermatozoides mantidos refrigerados. Neste contexto, a utilização de diluidores seminais alternativos para a refrigeração de sêmen dos animais, como a água de coco, vem alcançando bons resultados. Esse meio de conservação de células espermáticas apresenta como vantagens ser um produto natural, de origem vegetal, com matéria prima disponível em abundância na natureza para sua formulação e alta longevidade na forma de pó. Estudos envolvendo a utilização da água de coco para a preservação do sêmen de animais domésticos têm sido conduzidos com resultados bastante satisfatórios (Barros & Toniolli, 2011).

A associação entre diluidores e protetores de resfriamento é essencial para o sucesso da refrigeração espermática. A gema de ovo tem sido amplamente utilizada nos programas de reprodução assistida como protetor de resfriamento em diversas espécies. Esse composto orgânico possui lipoproteínas de baixa densidade presentes na porção plasmática que conferem uma ação crioprotetora aos espermatozoides, prolongando dessa forma, o período para utilização das células espermáticas (Neves & Henry, 2012). Pesquisas têm sido conduzidas no intuito de comparar diferentes meios de diluição adicionados com gema de ovo, sendo ainda necessário que se estabeleçam melhor esses parâmetros nos felinos domésticos para que protocolos mais eficazes possam ser extrapolados às espécies selvagens e aplicados com maior percentual de sucesso (Vick et al., 2012).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade de espermatozoides recuperados do epidídimo de gatos domésticos utilizando os diluidores ACP-117c e Tris após adição de gema de ovo e refrigeração a 4 °C por 24 horas.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostra do estudo

Este experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (No. 4627370/2014). Foram utilizados 4 gatos machos púberes, clinicamente saudáveis, pesando entre 2,5 e 5kg, sem determinação racial e que não apresentavam histórico de doenças reprodutivas, oriundos de proprietários particulares que desejavam castrar seus animais. Foram utilizados apenas animais clinicamente saudáveis, sem ferimentos nos órgãos reprodutivos externos e que apresentavam simetria e consistência

testicular normais. A partir desses animais, foi possível obter 8 epididimos.

Dessa forma, foram constituídos seis grupos, a saber: (A1): espermatozoides epididimários recuperados a fresco com ACP-117c; (A2): espermatozoides epididimários recuperados com ACP-gema; (A3): espermatozoides epididimários recuperados

com ACP-gema e mantidos sob refrigeração a 4°C por 24h; (T1): espermatozoides epididimários recuperados a fresco com Tris; (T2): espermatozoides epididimários recuperados com Tris-gema; (T3): espermatozoides epididimários recuperados com Tris-gema e mantidos sob refrigeração a 4°C por 24h (Figura 1).

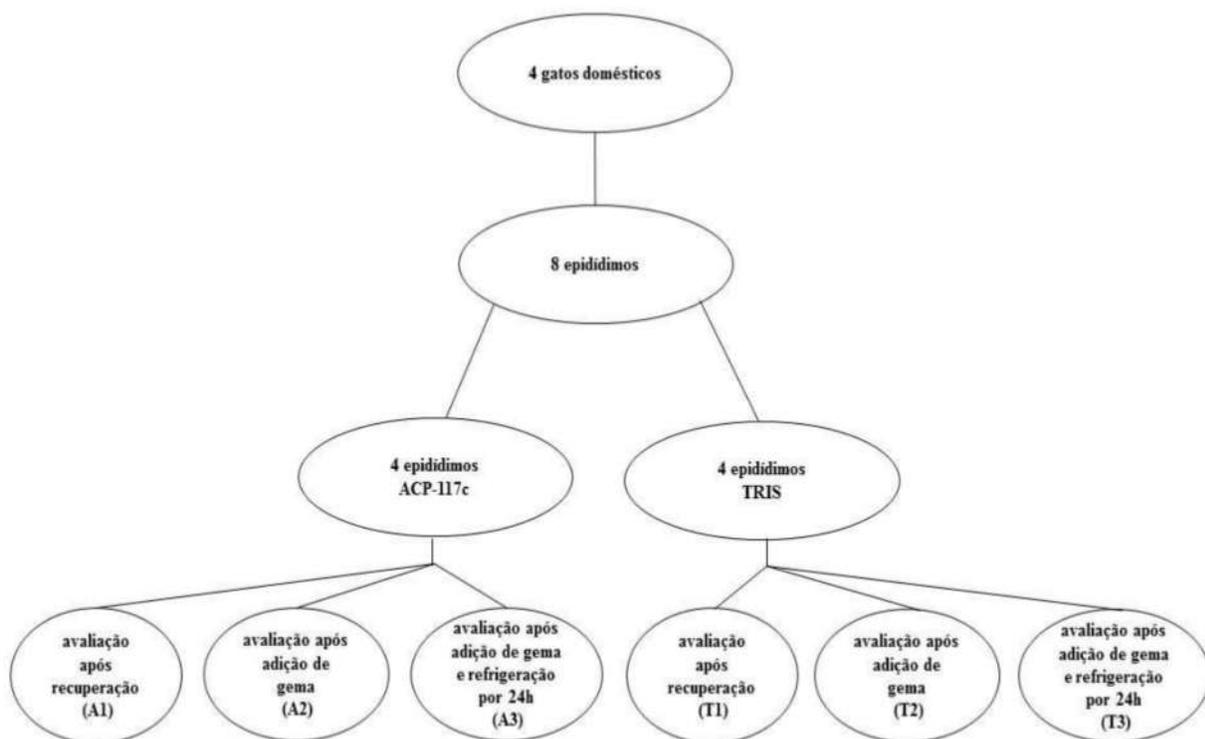


Figura 1: Distribuição dos grupos experimentais de acordo com o diluidor e grupo experimental .

Orquiectomia bilateral

No período pré-operatório, os animais foram submetidos a exame clínico geral, assim como avaliação macroscópica dos órgãos reprodutivos através da visualização e palpação. Assim, os gatos considerados aptos a participarem do estudo foram submetidos a jejum alimentar de 12 horas e hídrico de 6 horas, e então, encaminhados ao procedimento cirúrgico de orquiectomia bilateral.

O protocolo pré-cirúrgico constou de antibioticoterapia profilática com enrofloxacin (5 mg/kg, via intramuscular - IM), anti-inflamatório não esteroide meloxicam (0,2 mg/kg, IM) e para analgesia preemptiva cloridrato de tramadol (2 mg/kg, IM) (Viana, 2007). Como medicação pré-anestésica (MPA) foi utilizada acepromazina (0,2 mg/kg, IM) e cloridrato de xilazina (0,8 mg/kg, IM) (Cortopassi & Fantoni, 2009). Seguidos 15 minutos da MPA, a indução e manutenção anestésica foi instituída com cloridrato de cetamina (8 mg/kg) e diazepam (1mg/kg), ambos por via endovenosa e quando necessário, metade da dose inicial foi aplicada para repique anestésico (Valadão, 2009).

Posteriormente, os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico de orquiectomia bilateral (Boothe, 2007), e assim, foram obtidos os complexos testículo-epidídimo esquerdo e direito (CTE). Após a recuperação anestésica, os animais receberam alta hospitalar.

Recuperação das células espermáticas

Os CTE foram acondicionados em solução fisiológica a 0,9% e refrigerados por 2 horas. Após esse primeiro período de refrigeração, a recuperação dos espermatozoides epididimários foi realizada pela técnica de flutuação (Lima et al., 2014) modificada. Foi removido o tecido conjuntivo que recobre o epidídimo e realizou-se a dissecação dos contornos do ducto epididimário, com auxílio de uma lâmina de bisturi. Após a dissecação,

foi realizada uma lavagem externa do epidídimo com solução fisiológica previamente aquecida (37 °C). Realizada a lavagem externa, cada ducto epididimário foi colocado em placa de Petri também previamente aquecida (37 °C).

Logo após, diferentemente da técnica de flutuação tradicional, foram realizadas três injeções de ar contendo 1ml cada no lúmen epididimário (cabeça, corpo e cauda) e, em seguida, adicionados 0,5 ml de diluidor Tris (controle do experimento) ou ACP-117c (diluidor teste) no interior do epidídimo. Então, o epidídimo foi dividido em pequenos fragmentos com auxílio de duas lâminas de bisturi, deixando-o em repouso na placa de Petri por 1 minuto para que os espermatozoides entrassem em contato e migrassem para o diluidor. Com auxílio de um pipetador automático, alíquotas da solução obtida foram utilizadas para avaliação espermática. Espermatozoides de quatro epidídimos foram recuperados com ACP-117c, espermatozoides de quatro epidídimos com Tris e avaliados imediatamente pós-recuperação (avaliação dos tratamentos A1 e T1).

Adição da gema de ovo

Em seguida, 80µl da diluição foram acondicionados em um microtubo de 5mL juntamente com 20µl de gema de ovo. Essa nova diluição foi homogeneizada mecanicamente e uma alíquota de 10µl foi novamente avaliada (avaliação dos tratamentos A2 e T2).

Refrigeração com gema

A seguir, uma alíquota da diluição com gema foi armazenada em banho-maria sob refrigeração a 4°C por 24h e as células foram, então, novamente avaliadas (avaliação dos tratamentos A3 e T3).

Avaliação espermática

Para todos os grupos experimentais, os espermatozoides epididimários foram avaliados subjetivamente em microscópio óptico (100x) quanto aos parâmetros de motilidade total e vigor.

A motilidade total foi registrada em dados percentuais de células móveis variando entre 0 e 100%. O vigor espermático foi classificado em uma escala progressiva de 0 (ausência de movimento) a 5 (movimento vigoroso, retilíneo e progressivo).

Análise estatística

Os dados obtidos foram expressos em média e desvio padrão e analisados através do programa estatístico Graphpad Prism® versão 5.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk e posteriormente sofreram transformação angular em Arcoseno das porcentagens. As proporções encontradas para motilidade foram submetidas à análise de variância (ANOVA) seguidas do teste de Tukey para comparação entre os tempos de avaliação. Para comparação entre os diluidores foi aplicado o teste T. Os dados referentes ao vigor espermático foram avaliados pelo teste

de Mann-Whitney. Os resultados foram considerados significativos quando $P < 0,05$.

RESULTADOS

Comparação dentro do diluidor entre os tempos

A motilidade total e o vigor espermático reduziram significativamente após 24 horas (h) de refrigeração em comparação à avaliação a fresco em ambos os diluidores, entretanto, quando comparados o período de refrigeração por 24h e a avaliação imediata após a adição de gema, os parâmetros diferiram significativamente somente com o diluidor Tris (Tabela 1).

Comparação dentro do tempo entre os diluidores

A motilidade total a fresco e após a adição de gema de ovo não sofreu efeito do diluidor, no entanto após 24h de refrigeração, a motilidade espermática em A3 foi significativamente inferior ao T3. Com relação ao vigor espermático, este não foi afetado pelo diluidor utilizado ($P > 0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1. Média \pm DP da qualidade de espermatozoides epididimários recuperados com ACP-117c a fresco (A1), após adição de 20% de gema de ovo (A2) e refrigeração a 4 °C por 24h (A3) ou com Tris a fresco (T1), após adição de 20% de gema de ovo (T2) e refrigeração a 4 °C por 24h (T3).

| Parâmetros espermáticos | ACP-117c | | | TRIS | | |
|-------------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|------------------------------|------------------------------|--------------------------------|
| | A1 | A2 | A3 | T1 | T2 | T3 |
| Motilidade (%) | 76,3 \pm 25,0 ^{2A} | 66,3 \pm 38,2 ^{2bA} | 36,7 \pm 23,1 ^{1bA} | 91,3 \pm 7,5 ^{2A} | 87,5 \pm 9,6 ^{2A} | 56,7 \pm 35,1 ^{1bB} |
| Vigor (0-5) | 4,0 \pm 0,9 ^{2A} | 2,8 \pm 1,5 ^{2bA} | 2,2 \pm 1,4 ^{2bA} | 3,8 \pm 1,2 ^{2A} | 3,3 \pm 0,5 ^{2A} | 1,8 \pm 0,3 ^{2bA} |

Letras minúsculas sobrescritas diferentes na mesma linha significam que houve diferença estatística entre os tempos de avaliações dentro de cada diluidor ($P < 0,05$).

Letras maiúsculas sobrescritas diferentes na mesma linha significam que houve diferença estatística entre os diluidores nos diferentes tempos de avaliações ($P < 0,05$).

DISCUSSÃO

Nos gatos domésticos, o conhecimento sobre os danos celulares causados pelo processo de refrigeração ainda é insipiente, portanto, são necessários estudos que visem esclarecer a influência deste processo sobre os gametas masculinos de felinos, assim como o aperfeiçoamento dos protocolos de refrigeração, contribuindo dessa forma, para um melhor aproveitamento das células espermáticas em programas de reprodução assistida (Micheletti et al., 2011). No presente estudo, a associação entre os diluidores testados e a gema de ovo, em uma concentração de 20% logo após a recuperação espermática, possibilitou um meio em que os espermatozoides mantiveram a motilidade e o vigor dentro dos padrões desejados para aplicação prática nos programas de inseminação artificial.

Tanto para o ACP-117c quanto para o Tris, a motilidade e o vigor declinaram após 24h de refrigeração com gema de ovo quando comparadas à avaliação logo após a recuperação das células espermáticas, diferindo dos resultados obtidos por Macente et al. (2012), os quais, ao realizarem um experimento com espermatozoides epididimários de gatos utilizando um diluidor comercial com adição de gema de ovo não evidenciaram perdas na qualidade espermática após refrigeração por 24h. Pesquisas envolvendo a refrigeração de espermatozoides de gatos domésticos ainda produzem resultados variáveis, porém, cada estudo experimental pode contribuir para melhorar o desempenho reprodutivo de raças valiosas de gatos domésticos, assim como contribuir na conservação da biodiversidade de felinos selvagens em risco de extinção (Terrell et al., 2012).

O diluidor Tris foi superior ao ACP-117c na comparação dos grupos A3 e T3 para o parâmetro de motilidade total, entretanto o

vigor nesses dois grupos não diferiu. Na comparação entre os diluidores para os demais grupos experimentais, não foram encontradas diferenças nos parâmetros avaliados. Esses resultados diferiram dos encontrados por Emerenciano et al. (2013), que ao avaliarem os espermatozoides epididimários de gatos domésticos recuperados a fresco, o Tris havia sido superior ao ACP, entretanto, assim como na presente pesquisa, Mota Filho et al. (2013) ao realizarem um estudo com espermatozoides epididimários de cães, na recuperação a fresco não foram evidenciadas diferenças entre o ACP e o Tris.

Cardoso et al. (2010) avaliaram ejaculados caninos diluídos com ACP adicionada de 20% de gema de ovo e obtiveram resultados bastante satisfatórios na motilidade por um período de até 48 horas de refrigeração. A utilização do diluidor ACP associado a protetores de resfriamento ainda necessita de aprimoramento no intuito de melhorar a qualidade das células espermáticas após refrigeração.

CONCLUSÃO

Os diluidores ACP-117c e Tris foram eficientes em manter a qualidade mínima necessária dos parâmetros de motilidade e vigor de células espermáticas recuperadas do epidídimo de gatos domésticos após adição de gema de ovo, entretanto, após a refrigeração do recuperado a 4 °C por 24h houve uma redução considerável na qualidade dessas células. Portanto, novas pesquisas utilizando o diluidor ACP-117c e a recuperação de espermatozoides epididimários em gatos domésticos devem ser desenvolvidas no intuito de melhorar os resultados obtidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARROS, T.B.; TONIOLLI, R. Uso potencial da água de coco na tecnologia de sêmen.

Revista Brasileira de Reprodução Animal, v. 35, n. 4, p. 400-407, 2011.

BOOTHE, H. W. Testículos e epidídimos. In: SLATTER, D. H. Manual de cirurgia de pequenos animais. Barueri: Manole, 2007. p. 1521-1530.

CARDOSO, J.F.S.; PAULA, N.R.O.; UCHOA, D.C.; SILVA, L.D.M. Diferentes concentrações de gema de ovo na qualidade do sêmen canino diluído em ACP®-106 e resfriado a 4 °C. *Comunicata Scientiae*, v. 1, n. 2, p. 146-152, 2010.

COCCHIA, N.; CIANI, F.; EL-RASS, R.; RUSSO, M.; BORZACCHIELLO, G.; ESPOSITO, V.; MONTAGNARO, S.; AVALLONE, L.; TORTORA, G.; LORIZIO, R. Cryopreservation of feline epididymal spermatozoa from dead and alive animals and its use assisted reproduction. *Zygote*, v. 18, p. 1-8, 2009.

CORTOPASSI, S. R. G.; FANTONI, D. T. Medicação pré-anestésica. In: FANTONI, D.T., CORTOPASSI, S.R.G. Anestesia em cães e gatos. São Paulo: Roca, 2009.p. 217-227.

EMERENCIANO, K. D. M.; LIMA, G. L.; PEIXOTO, G. C. X.; SILVA, M. A.; OLIVEIRA, M. G. C.; PAULA, V.V.; SILVA, A. R. Recuperação de espermatozoides epididimários de gatos domésticos (*Felis catus*) utilizando soluções à base de tris ou água de coco em pó. *Acta Veterinaria Brasilica*, v. 7, n. 2, p. 148-153, 2013.

GOSDEN, R. Cryopreservation: a cold look at technology for fertility preservation. *Fertility and Sterility*, v. 96, n. 2, p. 264-268, 2011.

LIMA, D. B. C.; SILVA H. R.; CARVALHO G. G.; PINTO J. N.; PINHEIRO B. Q.; SILVA

L.D.M. Recuperação de espermatozoides epididimários de gatos domésticos através da técnica de flutuação. *Acta Veterinaria Brasilica*, v.8, Supl. 2, P. 198-199, 2014.

MACENTE, B. I.; MANSANO, C. F. M.; PEREIRA, M. M.; MARTINS, M. I. M.; GIOSO, M. M.; SAVI, P. A. P.; GUTIERREZ, R. R. Congelação de espermatozoides epididimários de gatos utilizando o diluidor Botu-crio® após refrigeração por 24 h em contêiner de transporte de sêmen Botu-tainer®. *Acta Veterinaria Brasilica*, v. 6, n. 2, p. 112-117, 2012.

MICHELETTI, T.; CUBAS, Z. S.; MORAES, W.; OLIVEIRA, M. J.; KOZICKI, L. E.; WEISS, R. R.; MOREIRA, N. Reprodução assistida em felídeos selvagens-uma revisão. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 35, n. 4, p. 408-417, 2011.

MOTA FILHO, A. C.; SILVA, H. V. R.; FREITAS, L. A.; NUNES, T. G. P.; ARAÚJO, A. A.; SILVA, L. D. M. Refrigeração do epidídimo canino a 4 °C e recuperação dos espermatozoides epididimários utilizando ACP-106c. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 33, n. 9, p. 1155-1160, 2013.

NEVES, M. M.; HENRY, M. Gema do ovo de galinha e a ação protetora de suas lipoproteínas de baixa densidade na criopreservação do sêmen: uma revisão. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 36, n. 4, p. 209-214, 2012.

TERRELL, K. A.; WILDT, D. E.; ANTHONY, N. M.; BAVISTER, B. D.; LEIBO, S. P.; PENFOLD, L. M.; MARKER, L. L.; CROSIER, A. E. Different patterns of metabolic cryo-damage in domestic cat (*Felis catus*) and cheetah (*Acinonyx jubatus*) spermatozoa. *Cryobiology*, v. 64, p. 110-117, 2012.

VALADÃO, C. A. A. Anestésicos dissociativos. In: FANTONI, D. T., CORTOPASSI, S. R. G. Anestesia em cães e gatos. São Paulo: Roca, 2009. p. 237-245.

VIANA, F. A. B. Guia Terapêutico Veterinário. Lagoa Santa: CEM, 2007. 336p.

VICK, M. M.; BATEMAN, H. L.; LAMBO, C. A.; SWANSON, W. F. Improved cryopreservation of domestic cat sperm in a chemically defined medium. *Theriogenology*, v. 78, p. 2120-2128, 2012.