



Obtenção e conservação do material genético do gato doméstico macho

Obtaining and preserving the genetic material of the male domestic cat

David Baruc Cruvinel Lima, Lúcia Daniel Machado da Silva¹

Laboratório de Reprodução de Carnívoros, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza-CE.

¹Correspondência: lucia.daniel.machado@hotmail.com

Resumo

As biotécnicas reprodutivas aplicadas ao gato doméstico desenvolveram-se consideravelmente nas últimas décadas, propiciando a conservação do material genético de animais com alto valor zootécnico, assim como avanços nos programas de conservação de espécies ameaçadas de extinção. Apesar dessa evolução, muitos aspectos relacionados à reprodução de gatos ainda não foram elucidados e os resultados apresentados na literatura ainda são conflitantes, o que impulsiona a busca de novas técnicas para obtenção, conservação e utilização das células germinativas provenientes desses animais. Dentre as técnicas de obtenção das células germinativas felinas têm-se a coleta por: eletroejaculação, vagina artificial, cateterismo uretral, recuperação epididimária e do tecido testicular. Neste contexto, o objetivo desta revisão foi descrever as principais técnicas de obtenção e conservação de material genético em gatos domésticos.

Palavras-chave: felino, reprodução, sêmen, espermatozoide.

Abstract

The reproductive biotechniques applied to the domestic cat have developed considerably in the last decades, promoting the conservation of biological material of animals with high zootechnical value, as well as advances in the conservation programs of endangered species. Despite this evolution, many aspects related to the reproduction of cats have not yet been elucidated and the results presented in the literature are still conflicting, which drives the search for new techniques for obtaining, conserving and using germ cells from these animals. Among the techniques for obtaining feline germ cells there are collection by: electroejaculation, artificial vagina, urethral catheterization, epididymal and testicular tissue recovery. In this context, the aim of this review was to describe the main techniques for obtaining and conserving genetic material in domestic cats.

Keywords: feline, reproduction, semen, sperm.

Introdução

O desenvolvimento de novas biotecnologias tem sido um dos pilares de pesquisas voltadas à reprodução do gato doméstico. Esse animal tem estado cada vez mais em convívio com os seres humanos, e também têm atuado como principal modelo experimental para avanços na conservação de espécies felinas ameaçadas de extinção (Silva et al., 2012; Lima et al., 2016a).

Entretanto, por serem animais que apresentam características reprodutivas singulares, como o elevado índice de teratospermia e as baixas taxas de viabilidade celular após conservação espermática a baixas temperaturas, torna-se difícil compará-los a outras espécies carnívoras e estabelecer protocolos adequados a todas as espécies felinas (Martins e Justino, 2015).

Mesmo com essas dificuldades, avanços vêm sendo obtidos nas formas de obtenção e conservação de material biológico de gatos machos. A manutenção desse material é essencial para resguardar o material genético de animais com alto índice zootécnico (Tsutsui, 2006). O conhecimento obtido com os avanços em gatos domésticos também pode ser extrapolado para estudos voltados às demais espécies felinas, que possuem cada vez mais populações menores e com baixa variabilidade genética (Villaverde et al., 2009).

Diferentes formas de obtenção de células espermáticas vêm sendo utilizadas em gatos domésticos, sendo elas: a eletroejaculação (Silva et al., 2011), a vagina artificial (Conforti et al., 2013), o cateterismo uretral (Zambelli et al., 2010), a recuperação dos espermatozoides epididimários (Lima et al., 2014) e mais recentemente, células germinativas oriundas do tecido testicular (Lima et al., 2016a).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi descrever as principais formas de obtenção e conservação de material genético em gatos domésticos.



Técnicas para obtenção e conservação do material genético do gato doméstico

Eletroejaculação

Dentre as formas de obtenção do sêmen em gatos domésticos, a eletroejaculação se caracteriza como o método de eleição, por ser realizada com o animal anestesiado, o que dispensa treinamento dos animais para coleta, assim como proporciona maior segurança ao operador e animais no momento da coleta (Martins e Justino, 2015).

Esta técnica se caracteriza pela realização de uma série de estímulos elétricos por meio de uma sonda trans-retal acoplada a um estimulador elétrico no assoalho da ampola retal dos animais (Silva et al., 2011) e o sêmen obtido pode ser utilizado a fresco para inseminação imediatamente após a coleta ou pode ser congelado para utilização futura (Chatdarong et al., 2007).

Ao realizarem a eletroejaculação em gatos domésticos com diferentes protocolos anestésicos, Silva et al. (2008) obtiveram sucesso na obtenção do ejaculado em até 100% dos animais, quando anestesiados com isoflurano, com motilidade total superior a 55% e vigor 3. Taxas de viabilidade celular a fresco acima de 80% também já foram obtidas após eletroejaculação em gatos e acima de 68% após congelamento-descongelamento (Zambelli et al., 2008).

Neste mesmo estudo, foi obtida uma taxa de formação de blastocisto acima de 24% com sêmen congelado-descongelado após fertilização e cultivo *in vitro* de oócitos maduros (Zambelli et al., 2008). Após inseminação artificial com sêmen obtido por eletroejaculação, foi alcançada uma taxa de gestação acima de 30% utilizando sêmen a fresco e acima de 40% com sêmen congelado-descongelado (Chatdarong et al., 2007).

Vagina artificial

A coleta de sêmen de gatos domésticos por meio da vagina artificial tem sido empregada por se tratar de uma técnica de baixo custo; todavia, é necessário o treinamento dos machos reprodutores previamente, porém, nem todos os animais aprendem adequadamente a ejacular na vagina artificial (Tanaka et al., 2000; Martins e Justino, 2015).

O sêmen obtido após a coleta pode ser utilizado imediatamente para a inseminação artificial (Axné; Linde-Forsberg, 2002) ou adicionado de diluidores como o Tris e mantido sob refrigeração de 4 a 5 °C para utilização em um curto período (Silva et al., 2012). Na congelamento, o sêmen pode ser mantido em nitrogênio líquido por um período indeterminado; na solução de congelamento, além do diluidor, também são adicionados crioprotetores como o glicerol, que irão atuar impedindo a formação de cristais de gelo no interior das células durante o processo de congelamento (Martins e Justino, 2015).

A capacidade de fertilização dos espermatozoides obtidos com a vagina artificial já foi demonstrada com altas taxas de gestação após inseminação a fresco, sendo em torno de 70% de taxa de gestação (Conforti et al., 2013). A utilização de sêmen congelado de gatos domésticos também já foi relatada com sucesso, com taxas de gestação de 75% (Villaverde et al., 2009).

Cateterismo uretral

Outra possibilidade para obtenção do ejaculado em gatos domésticos é o cateterismo uretral, que é realizado com o animal sob efeito dos fármacos anestésicos alpha-2-adrenérgicos, em especial a medetomidina. A ação desses fármacos promove a liberação das células espermáticas na uretra (Zambelli et al., 2008; Lueders et al., 2012).

Os animais são anestesiados e um cateter urinário é introduzido aproximadamente 9 cm na uretra e retirado em seguida contendo o ejaculado presente no canal uretral (Filliers et al., 2010). Ao avaliarem diferentes doses e tempo de coleta após administração de medetomidina, Cunto et al. (2015) constataram que a dose de 130 µg/kg por via intramuscular (IM) com coleta imediata após o início da ação do fármaco propicia uma melhor qualidade seminal. A utilização da xilazina (1mg/kg, IM) para indução da ejaculação não permitiu a obtenção de células espermáticas em gatos domésticos (Swanson et al., 2016).

O sêmen obtido com essa técnica de coleta apresenta qualidade comparável à de outras formas de obtenção do ejaculado em gatos domésticos, como motilidade total e viabilidade celular acima 70% e morfologia normal acima de 50% na avaliação a fresco (Prochowska et al., 2015). Após o processo de congelamento-descongelamento, os resultados ainda se encontram em um patamar de qualidade aceitável, como motilidade aproximada de 37%, morfologia normal de 60% e viabilidade acima de 30% (Prochowska et al., 2016).

Foi obtida uma motilidade total acima de 40% após congelamento lento e de 37% após vitrificação de sêmen obtido por cateterismo uretral (Swanson et al., 2016). Após realizarem a fertilização *in vitro* de oócitos maduros de gatos domésticos com sêmen obtido por meio do cateterismo uretral, Filliers et al. (2010) conseguiram mais de 50% de oócitos em metáfase II. Já Swanson et al. (2016), obtiveram 35% de oócitos em metáfase II após a fertilização *in vitro* com sêmen vitrificado e 65% após congelamento lento.



Espermatozoides epididimários

A recuperação de espermatozoides provenientes da cauda do epidídimo é uma biotecnologia aplicável em animais com valor zootécnico elevado que tenham ido a óbito precoce ou inesperado, cujo potencial genético deve ser resguardado e propagado em futuras gerações (Lima, 2015).

Dentre as técnicas de obtenção de espermatozoides epididimários, a de flutuação se caracteriza como uma opção em pequenos animais, inclusive no gato. Em decorrência do pequeno tamanho do epidídimo desses animais, quando comparado ao dos animais de produção, existe uma maior dificuldade na aplicação de outras técnicas de recuperação espermática. Essa forma de coleta consiste, após a orquiectomia e obtenção do complexo testículo-epidídimo, na dissecação e separação do epidídimo dos demais componentes do sistema reprodutor masculino, em que são realizados cortes e os fragmentos do epidídimo misturados com um diluidor no intuito de os espermatozoides migrarem para o meio de diluição e facilitarem sua recuperação (Emerenciano et al. 2013).

Outra metodologia também já descrita em pequenos animais é a técnica de compressão. Essa técnica consiste na orquiectomia dos animais, dissecação do epidídimo, isolamento da porção caudal epididimária e parte do ducto deferente. Em seguida, com auxílio de uma pinça hemostática (Tebet, 2004) ou lâmina de vidro (Macente, 2014), realiza-se a compressão dessas estruturas, depositando o recuperado espermático em uma placa de Petri contendo o diluidor.

Em um estudo realizado com gatos domésticos, as células espermáticas obtidas do epidídimo e avaliadas a fresco apresentaram uma motilidade total de 73% e vigor 3,5 utilizando os diluidor Tris, entretanto com o diluidor ACP, a motilidade foi de 44% e vigor 3 (Emerenciano et al., 2013). Em contraste com este estudo, Lima et al. (2016b), ao refrigerarem o complexo testículo-epidídimo de gatos domésticos por até 4 horas antes da recuperação, obtiveram uma motilidade acima de 70% com ACP-117c após o período de refrigeração e vigor 4,3, enquanto que ao utilizarem o diluidor Tris, a motilidade foi de 67% e vigor 3,8. Apesar dessas diferenças, observa-se que em ambos os estudos, a qualidade dos espermatozoides ficou dentro dos padrões necessários para viabilizar a fertilização *in vitro* ou *in vivo*.

A conservação de células epididimárias sob refrigeração a 4 °C foi avaliada por Lima et al. (2014) e os autores obtiveram uma motilidade acima de 36% e vigor 2 após 24 horas de refrigeração em meio diluidor à base de água de coco em pó e motilidade acima de 56% com vigor 1,8 após refrigeração em meio diluidor à base de Tris, com adição de 20% de gema em ambos meios diluidores.

A motilidade total e a viabilidade espermática de gatos domésticos após descongelação de espermatozoides epididimários congelados em palhetas de 0,25mL foi de 32% e 45%, respectivamente (Cocchia et al., 2009).

Tecido testicular

As pesquisas realizadas com o tecido testicular de gatos domésticos têm se direcionado ao desenvolvimento de protocolos que envolvam a melhor técnica de conservação a baixas temperaturas, como em um estudo realizado por Buarpong et al. (2013) que compararam os aspectos morfológicos do tecido testicular de gatos domésticos púberes entre a congelação lenta e a congelação rápida, sendo que a congelação lenta apresentou melhor conservação das estruturas teciduais. Os autores também constataram a capacidade fertilizante dos espermatozoides obtidos após a descongelação dos fragmentos testiculares, que foram capazes de fertilizar oócitos maduros *in vitro*, com desenvolvimento embrionário até a fase de blastocisto.

Outro aspecto que os estudos com gatos domésticos têm procurado desvendar é qual crioprotetor ou associações de crioprotetores exercem menor efeito tóxico sobre a estrutura testicular. Lima et al. (2016a) avaliaram diferentes associações de crioprotetores na vitrificação do tecido testicular de gatos domésticos impúberes e constataram que a associação de dimetilsulfóxido/glicerol conservou melhor as estruturas teciduais e manteve um maior potencial de proliferação celular quando comparado às associações dimetilsulfóxido/etilenoglicol e etilenoglicol/glicerol.

Macente et al. (2016) compararam a atuação do glicerol e propanodiol na congelação rápida de fragmentos testiculares de gatos domésticos púberes e a morfologia foi mais bem preservada com glicerol. Neste mesmo estudo também foi avaliado o tamanho dos fragmentos testiculares, sendo que os fragmentos com 0,5cm³ apresentaram menos efeitos deletérios sobre as células germinativas que os com 0,3cm³.

Uma das formas de completar o desenvolvimento da espermatogênese após coleta e congelação de fragmentos testiculares é por meio do transplante destes fragmentos no tecido subcutâneo de camundongos imunodeficientes, processo conhecido como xenotransplante (Yokonishi et al., 2014). Esse processo já foi relatado em gatos domésticos por Mota et al. (2012), que congelaram fragmentos testiculares de gatos domésticos impúberes e púberes por meio da técnica de congelação lenta, tendo o dimetilsulfóxido como crioprotetor e constataram que o tecido testicular oriundo de animal impúbere apresentou uma maior quantidade de fragmentos com células germinativas após 10 semanas de xenotransplante em camundongos imunodeficientes.



Apesar de já existirem estudos avaliando o potencial do tecido testicular de gatos domésticos como fonte de células espermáticas, os resultados obtidos até o presente momento ainda não são suficientes para implementação prática dessa biotecnologia nos programas de reprodução assistida, sendo necessário o desenvolvimento de técnicas de conservação a baixas temperaturas mais eficazes e pesquisas que desenvolvam meios de cultivo *in vitro* com células germinativas viáveis e funcionais, permitindo dessa forma, a obtenção de filhotes de alto valor zootécnico, saudáveis e férteis.

Conclusão

Diferentes técnicas para obtenção e conservação do material genético de gatos domésticos podem ser utilizadas e os resultados obtidos até o presente momento expressam os avanços conquistados na reprodução de gatos, todavia, ainda são necessárias novas abordagens que permitam a repetição de protocolos na prática clínica e maiores taxas de gestação por meio da inseminação artificial nesta espécie.

Referências

- Axnér E, Linde-Forsberg C.** Semen collection and assessment, and artificial insemination in the cat. In: Concannon PW, England G, Verstagen J e Linde-Forsberg C (Ed.), Recent Advances in Small Animal Reproduction. International Veterinary Information Service, Ithaca, New York, 2002. Disponível em: <http://www.ivos.org>. Acesso em 15 fev. 2017.
- Buarpung S, Tharasanit T, Comizzoli P, Techakumphu M.** Feline spermatozoa from fresh and cryopreserved testicular tissues have comparable ability to fertilize matured oocytes and sustain the embryo development after intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology*, v.79, p.149-158, 2013.
- Chatdarong K, Axnér E, Manee-In S, Thuwanut P, Linde-Forsberg C.** Pregnancy in the domestic cat after vaginal or transcervical insemination with fresh and frozen semen. *Theriogenology*, v.68, p.1326-1333, 2007.
- Cocchia N, Ciani F, El-Rass R, Russo M, Borzacchiello G, Esposito V, Montagnaro S, Avallone L, Tortora G, Lorzio R.** Cryopreservation of feline epididymal spermatozoa from dead and alive animals and its use in assisted reproduction. *Zygote*, v.18, p.1-8, 2009.
- Conforti VA, Bateman HL, Schook MW, Newsom J, Lyons LA, Grahn RA, Deddens JA, Swanson WF.** Laparoscopic oviductal artificial insemination improves pregnancy success in exogenous gonadotropin-treated domestic cats as a model for endangered felids. *Biol Reprod*, v.89, p.1-9, 2013.
- Cunto M, Kuster DG, Bini C, Cartolano C, Pietra M, Zambelli D.** Influence of different protocols of urethral catheterization after pharmacological induction (Ur.Ca.P.I) on semen quality in the domestic cat. *Reprod Domest Anim*, v.50, p.999-1002, 2015.
- Emerenciano KDM, Lima GL, Peixoto GCX, Silva MA, Oliveira MGC, Paula VV, Silva AR.** 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, p.148-153, 2013.
- Filliers M, Rijsselaere T, Bossaert P, Zambelli D, Anastasi P, Hoogewijs M, Van Soom A.** In vitro evaluation of fresh sperm quality in tomcats: a comparison of two collection techniques. *Theriogenology*, v.74, p.31-39, 2010.
- Lima DBC, Silva TFP, Aquino-Cortez A, Pinto JN, Caldini BN, Magalhães FF, Silva LDM.** Avaliação de espermatozoides epididimários de gatos domésticos após recuperação com ACP-117c ou tris, adição de gema e refrigeração a 4 °C por 24h. *Cienc Anim*, v.24, p.3-10, 2014.
- Lima DBC, Silva TFP, Aquino-Cortez A, Pinto JN, Magalhães FF, Caldini BN, Silva LDM.** Recovery of sperm after epididymal refrigeration from domestic cats using ACP-117c and tris extenders. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.68, p.873-881, 2016b.
- Lima DBC, Silva TFP, Moraes GB, Aquino-Cortez A, Evangelista JSAM, Xavier Júnior FAF, Viana DA, Silva LDM.** Different associations of cryoprotectants for testicular tissue of prepubertal cats submitted to vitrification. *Reprod Domest Anim*, v.51, p.1-7, 2016a.
- Lima DBC.** Espermatozoides epididimários de gatos domésticos: avaliação após refrigeração e diluição em água de coco em pó (ACP-117c). 2015. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2015.
- Lueders I, Luther I, Scheepers G, Van Der Horst G.** Improved semen collection method for wild felids: Urethral catheterization yields high sperm quality in African lions (*Panthera leo*). *Theriogenology*, v.78, p.696-701, 2012.
- Macente BI.** Congelamento de células espermáticas provenientes de epidídimo de gatos domésticos contendo antioxidante no meio diluidor. 2014. 69f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2014.
- Macente BI, Toniollo GH, Apparicio M, Mansano CFM, Thomé HE, Canella CL, Tozato MEG, Gutierrez RR.** Evaluation of different fragment sizes and cryoprotectants for cryopreservation of feline testicular tissues. *Reprod Domest Anim*, v.51, p.1-6, 2016.



- Martins MIM, Justino RC.** Criopreservação espermática em felinos: estado da arte. *Rev Bras Reprod Anim*, v.39, p.136-140, 2015.
- Mota PC, Ehmcke J, Westernströer B, Gassei K, Santos JR, Schlatt S.** Effects of different storage protocols on cat testis tissue potential for xenografting and recovery of spermatogenesis. *Theriogenology*, v.77, p.299-310, 2012.
- Prochowska S, Nizánski W, Ochota M, Partyka A.** Characteristics of urethral and epididymal semen collected from domestic cats - a retrospective study of 214 cases. *Theriogenology*, v.84, n.9, p.1565-1571, 2015.
- Prochowska S, Nizánski W, Partyka A.** Comparative analysis of *in vitro* characteristics of fresh and frozen-thawed urethral and epididymal spermatozoa from cats (*Felis domesticus*). *Theriogenology*, v.86, p.2063-2072, 2016.
- Silva TFP, Ackermann CL, Silva LDM.** Desafios para o desenvolvimento da tecnologia da criopreservação de sêmen felino. *Cienc Anim*, v.22, p.143-160, 2012.
- Silva TFP, Dias CGA, Ackermann CL, Pinheiro FTS, Braga ACP, Silva LDM.** Avaliação de segurança e analgesia de protocolos anestésicos para eletroejaculação em gatos domésticos (*Felis catus*). *Cienc Anim Bras*, v.12, p.497-505, 2011.
- Silva TFP, Dias CGA, Cardoso JFS, Uchoa DC, Braga ACP, Ackermann CL, Pinheiro FTS, Brilhante DFM, Carneiro RD, Tavernezi L, Quinto HR, Silva LDM.** Comparação de quatro protocolos anestésicos para a coleta de sêmen por eletroejaculação em gatos domésticos. *Cienc Anim*, v.18, p.15-23, 2008.
- Swanson WF, Bateman HL, Vansandt LM.** Urethral catheterization and sperm vitrification for simplified semen banking in felids. *Reprod Dom Anim*, v.51, p.1-6, 2016.
- Tanaka A, Kuwabara S, Takagi Y, Nakagawa K, Fujimoto Y, Murai M, Tsutsui T.** Effect of ejaculation intervals on semen quality in cats. *J Vet Med Sci*, v.62, p.1157-1161, 2000.
- Tebet MJ.** Efeito da criopreservação sobre a célula espermática em três espécies de felinos: o gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus* - Schreber, 1775), a jaguatirica (*Leopardus pardalis* - Linnaeus, 1758) e o gato doméstico (*Felis catus*). 2004. 145f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004.
- Tsutsui T.** Artificial insemination in domestic cats (*Felis catus*). *Theriogenology*, v.66, p.122-125, 2006.
- Villaverde AISB, Melo CM, Martin I, Ferreira TH, Papa FO, Taconeli CA, Lopes MD.** Comparison of efficiency between two artificial insemination methods using frozen-thawed semen in domestic cat (*Felis catus*). *Anim Reprod Sci*, v.114, p.434-442, 2009.
- Yokonishi T, Sato T, Komeya M, Katagiri K, Kubota Y, Nakabayashi K, Hata K, Inoue K, Ogonuki N, Ogura A, Ogawa T.** Offspring production with sperm grown *in vitro* from cryopreserved testis tissues. *Nat Commun*, v.5, p.1-6, 2014.
- Zambelli D, Prati F, Cunto M, Iacono E, Merlo B.** Quality and *in vitro* fertilizing ability of cryopreserved cat spermatozoa obtained by urethral catheterization after medetomidine administration. *Theriogenology*, v.69, p.485-490, 2008.
- Zambelli D, Raccagni R, Cunto M, Andreani G, Isani G.** Sperm evaluation and biochemical characterization of cat seminal plasma collected by electroejaculation and urethral catheterization. *Theriogenology*, v.74, p.1396-1402, 2010.
-