



Exame andrológico e criopreservação de sêmen em felídeos selvagens

Andrological evaluation and semen cryopreservation in wild felids

Nei Moreira¹

Departamento de Biociências, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Palotina, PR, Brasil.

¹Correspondência: neimoreira@ufpr.br

Resumo

Uma primeira etapa básica e essencial para a aplicação de biotécnicas da reprodução é a coleta e avaliação do sêmen, seguida da sua criopreservação. Apresentamos aqui alguns protocolos, com base em resultados publicados e observações pessoais, para as diferentes espécies de felídeos selvagens. Para felídeos domésticos e selvagens, a eletroejaculação é o método mais frequentemente utilizado para coleta de sêmen. A coleta por vagina artificial, algumas vezes empregada em gatos domésticos e já descrita para guepardos, exige o condicionamento do animal e a habituação ao coletor. A cateterização uretral, associada a fármacos que promovem a ejaculação, surge também como uma outra opção para coleta de sêmen.

Palavras-chave: conservação da biodiversidade, banco de reserva genômica, felinos.

Abstract

A basic and essential first step in the application of reproduction biotechniques is the semen collection and evaluation, followed by its cryopreservation. We present here some protocols, based on published results and personal observations, for the different species of wild felids. For domestic and wild felids, electroejaculation is the most frequently used method for collecting semen. Collection by artificial vagina, sometimes used in domestic cats and already described for cheetahs, requires the conditioning of the animal and habituation to the collector. Urethral catheterization, associated with drugs that promote ejaculation, also appears as another option for semen collection.

Keywords: biodiversity conservation, genomic resource bank, feline.

Introdução

Considerando o grau de ameaça crescente que a grande maioria das populações de felídeos selvagens vêm sofrendo, torna-se necessária a aplicação de esforços conjuntos e interdisciplinares na sua conservação. Com o objetivo de manter e maximizar a variabilidade genética, técnicas de reprodução assistida podem ser utilizadas como ferramentas auxiliares para a conservação. Uma primeira etapa básica e essencial para a aplicação de biotécnicas da reprodução é a coleta e avaliação do sêmen, seguida da sua criopreservação. Dessa forma podemos selecionar indivíduos aptos tanto à reprodução natural como ao fornecimento de espermatozoides para uso imediato, refrigeração ou criopreservação.

Outro ponto importante a ser considerado é o envelhecimento das atuais populações em cativeiro. Muitas teorias tentam explicar como os organismos envelhecem: evolução, genética, dano metabólico, senescência celular e acúmulo de toxinas – e o final é provavelmente o resultado da combinação de vários desses. Fatores tais como genética e ambiente parecem estar envolvidos em como o animal envelhece (Longley, 2012). Do ponto de vista conservacionista, estes indivíduos em cativeiro estão envelhecendo, ficando mais predispostos a doenças e diminuindo a qualidade de seus gametas.

Alterações fenotípicas podem ser vistas com o envelhecimento – por exemplo na pelagem, na pele ou condição corporal (com a perda de massa muscular). Alterações fisiológicas internas são menos óbvias. Em animais em vida livre, essas alterações frequentemente resultam no indivíduo sucumbindo à doença, predação ou fome. Os animais em cativeiro estão protegidos disso, portanto sua sobrevivência é maior, mas enquanto a população em cativeiro de felídeos envelhece, vemos mais alterações degenerativas relacionadas à idade. O mesmo acontece com os gametas e o ambiente uterino.

Normalmente para o exame andrológico em felídeos selvagens é necessária a contenção química. A anestesia sempre apresenta risco em qualquer idade do animal, mas indivíduos idosos são mais prováveis de apresentarem doença crônica ainda não diagnosticada ou disfunção orgânica degenerativa que pode aumentar o risco. Antes da administração dos fármacos anestésicos, alguns fatores devem ser considerados, incluindo o estado de saúde, a atitude e peso corporal, que podem afetar como o indivíduo irá reagir aos fármacos e ao procedimento (ex.: eletroejaculação). De forma ideal, os animais deveriam ser treinados para a flebotomia e permitissem, estando conscientes, a coleta de sangue de tal forma que os parâmetros sanguíneos pudessem ser avaliados antes da anestesia. Porém sabemos que, quando se trata de animais selvagens, isto é apenas teórico e



difícil de ser realizado, na grande maioria das vezes. Informações do histórico do animal são extremamente valiosas. Na nossa experiência, preferimos não coletar sêmen de animais muito idosos ou com histórico de cardiopatia ou complicação anestésica anterior, do que submeter o animal aos riscos associados. Os parâmetros fisiológicos, incluindo pressão arterial, devem ser monitorados durante a anestesia, e os desvios (como hipotensão) devem ser corrigidos com a administração apropriada de fluido. A manutenção de um acesso venoso é, portanto, essencial e recomendada.

A doença renal crônica é comumente reportada como uma razão significativa para morbidade e mortalidade em felídeos geriátricos não domésticos, portanto o ideal é uma avaliação da função renal prévia à anestesia para coleta de sêmen.

O objetivo desse artigo é fornecer informações úteis e práticas com relação à coleta, avaliação e criopreservação de sêmen em felídeos selvagens.

Métodos para coleta de sêmen

A coleta de sêmen deve fornecer ejaculados com adequada concentração espermática e motilidade, com mínimo estresse ao animal. Em animais domésticos, como suínos, equinos e bovinos, o uso da vagina artificial permite a coleta de um ejaculado de boa qualidade. Infelizmente, devido ao temperamento de predador dos felídeos selvagens e ao risco associado para o coletor, esse método raramente pode ser utilizado, tendo sido relatado em guepardos habituados ao ser humano. Mesmo em gatos domésticos que são ocasionalmente coletados com vagina artificial, há relatos de que só permitem a coleta por determinadas pessoas, a quem já estão habituados.

Os métodos mais comuns para a coleta de sêmen em felídeos são por eletroejaculação (Scott e Cats, 1970) ou vagina artificial no gato doméstico (Sojka et al., 1970); ambos permitem a coleta de sêmen total com boa qualidade que pode ser utilizado para diferentes propósitos. Espermatozoides também podem ser obtidos por lavagem ou fatiamento (*slicing*) do epidídimo (Hay e Goodrowe, 1993) ou outras técnicas, como a cateterização uretral.

A obtenção de sêmen por lavado vaginal após o coito já foi descrita em gatas domésticas (Sojka, 1986), mas tem pouca aplicação prática em felídeos selvagens.

Para felídeos selvagens e domésticos, a eletroejaculação (EE) é o método mais comum para coleta de sêmen. Entretanto, o equipamento (eletroejaculador) é caro, há risco de contaminação por urina e os animais geralmente mostram fortes contrações musculares apesar da anestesia geral (Lueders, 2012).

Um outro método é a cateterização uretral, descrita para o gato doméstico e para espécies selvagens, como o leão-africano (Lueders, 2012). Consiste na utilização de um fármaco anestésico que também estimule a liberação de sêmen na uretra, como a medetomidina (um α_2 -agonista), associado a outro, como por exemplo a cetamina, com eventual auxílio da ultrassonografia transretal para localizar a próstata. Em leões africanos foi descrita a utilização de um cateter urinário canino (com diâmetro de 2,6 ou 3,3 mm), inserido aproximadamente 30 cm na uretra para permitir a coleta de sêmen no lúmen do cateter por capilaridade. Após a retração, foram obtidos (média \pm DESVPAD) volumes espermáticos de $423 \pm 29 \mu\text{l}$, com motilidade de $89 \pm 13\%$, com uma concentração espermática média de $1,94 \times 10^9/\text{ml}$ (Lueders et al., 2012). Houve também relatos de sucesso com o uso dessa técnica em gato-da-selva (*Felis chaus*) (Kheirkhah et al., 2017).

Espermatozoides coletados do epidídimo (especialmente da cauda do epidídimo) por compressão (*squeezing*) ou fatiamento (*slicing*) são frequentemente usados para pesquisa com a vantagem de obter gametas masculinos após a morte do animal ou após a orquiectomia. A análise do sêmen é essencial para a avaliação da fertilidade dos machos, mas tem sido superficial, devido à dificuldade em obter sêmen, tanto quanto seu pequeno volume em pequenos felídeos.

A eletroejaculação no gato foi relatada primeiro por Scott em 1970 e então usada em muitos outros estudos. Por razões físicas (ex. fratura seguida de não união de um dos membros pélvicos) ou psicológicas (ex. machos *serial killers*), alguns machos não podem ser usados na reprodução natural. Além disso, a eletroejaculação é preferida devido a não necessitar de uma fêmea no cio ou de treinamento prévio do macho, portanto pode ser realizada em qualquer macho que possa ser anestesiado com segurança (Sojka, 1986). Alguns estudos reportaram os efeitos da voltagem, coleta sequencial, coleta durante longo período e fluxo retrógrado nas características seminais. Há considerável variação entre espécies e entre indivíduos da mesma espécie com relação ao volume do ejaculado e número de espermatozoides ejaculados em resposta à estimulação elétrica, além disso a anestesia repetida e a eletroejaculação parecem não alterar a capacidade ejaculatória ou causar efeitos nocivos aos machos (Pineda et al., 1984). Ao contrário, em nossa experiência, no caso de machos que estão em repouso sexual durante muito tempo, a eletroejaculação tem um efeito benéfico, melhorando a qualidade do sêmen a partir da segunda coleta, por estimular a espermatogênese e remover espermatozoides armazenados por longo período.

O número de espermatozoides coletados por eletroejaculação é dependente da voltagem da estimulação e do número de estímulos elétricos. Geralmente o número de espermatozoides em eletroejaculados coletados com 4 ou 5 V é maior que com 1 ou 2 V, porém algumas vezes a estimulação com altas voltagens pode resultar

em contaminação por urina. A posição do transdutor retal (*probe*) muito cranial também pode aumentar a chance de contaminação por urina, que pode ser facilmente detectada pelo volume, cor, aspecto e pH ácido característico da urina de carnívoros. O pH do sêmen coletado por eletroejaculação (EE) tende a ser maior que o pH do sêmen coletado por vagina artificial (VA). O aumento da alcalinidade pode ser devido à exposição do sêmen ao ambiente durante a coleta ou ao aumento da contribuição das glândulas sexuais acessórias induzido pela estimulação elétrica (Dooley e Pineda, 1986). Amostras seminais obtidas usando uma vagina artificial tendem a ter um menor volume e mais espermatozoides (maior concentração espermática) do que o sêmen coletado por eletroejaculação (Dooley e Pineda, 1986). Vários protocolos anestésicos têm sido relatados para felídeos, como o cloridrato de cetamina, usado sozinho (apesar de aumentar o risco de convulsões e não proporcionar adequado relaxamento muscular), ou em associação com a medetomidina. Outra opção é a associação de xilazina com a tiletamina + zolazepam. Busca-se sempre um protocolo anestésico que proporcione segurança ao paciente, adequada anestesia com bom relaxamento muscular e ausência de contaminação do sêmen com urina.

Dooley et al. (1991) reportaram que um número apreciável de espermatozoides são perdidos devido ao fluxo retrógrado para o interior da bexiga urinária durante a eletroejaculação, e que essa perda retrógrada também tem sido observada durante a monta natural ou coleta de sêmen por vagina artificial. Portanto, o fluxo retrógrado não é um artefato oriundo da estimulação elétrica ou da anestesia (cetamina ou medetomidina), mas sim um componente do processo ejaculatório em gatos (Dooley et al., 1991). Para efeitos de comparação entre espécies, entre indivíduos da mesma espécie e entre coletas do mesmo indivíduo, na nossa prática seguimos o protocolo de eletroejaculação proposto por Howard et al. (1990).

Análise espermática

O sêmen é avaliado com relação a volume, pH e concentração espermática, porcentagem de motilidade, motilidade progressiva e morfologia espermática. A análise química do plasma seminal também pode ser realizada, como a osmolaridade. Autores têm reportado os parâmetros espermáticos normais para várias espécies de felídeos.

Na prática, a motilidade espermática e a viabilidade (usando por exemplo a coloração com eosina-nigrosina), morfologia e concentração espermática devem ser avaliadas. Além disso, a determinação da integridade da membrana espermática e acrossomal (usando eletromicroscopia de transmissão ou microscopia com fluorescência), a análise química do sêmen (como por exemplo a osmolaridade do plasma seminal) e outros parâmetros podem ser importantes para a avaliação tanto do sêmen fresco como do congelado-descongelado.

Criopreservação do sêmen em felídeos

A preservação do sêmen é uma técnica útil para a manutenção de recursos biológicos em animais selvagens e domésticos. Classicamente, o sêmen de felídeos não domésticos tem sido congelado em meios de congelamento baseados em gema de ovo. Entretanto, a inclusão de gema de ovo é problemática, resultando em possível variação entre partidas ou lotes na produção, contaminação microbiana e possíveis restrições regulamentares relacionadas ao transporte internacional de sêmen. Em nossas pesquisas anteriores e em nossa prática temos preferido a utilização de meios comerciais, pela facilidade de obtenção e maior controle de qualidade com relação aos ingredientes, como antimicrobianos e ovos SPF (*specific pathogen free*).

Vansandt et al. (2016) publicaram um artigo em que testaram um meio de criopreservação contendo lecitina de soja *versus* outro meio contendo gema de ovo, em gato-de-Pallas (*Otocolobus manul*) e gato-pescador (*Prionailurus viverrinus*). Os resultados foram similares com relação à porcentagem de clivagem de embriões, o que mostra que o meio contendo lecitina de soja é uma alternativa efetiva à gema de ovo para a criopreservação espermática nessas duas espécies de felídeos não domésticos.

A substituição de um meio de criopreservação baseado em gema de ovo por uma opção quimicamente definida, livre de proteína animal pode representar um avanço no controle de qualidade e biossegurança para o banco de sêmen de felídeos, porém ainda deve ser testada em outras espécies.

Um novo método de preservação foi desenvolvido que permite que o sêmen seja armazenado por um longo período em um refrigerador a 4°C. Os espermatozoides são liofilizados em uma solução contendo 10 mM Tris e 1 mM EDTA. Usando esse método, o nitrogênio líquido não é requerido para o armazenamento e transporte do sêmen. Os autores demonstraram que o sêmen de chimpanzé, girafa, onça-pintada, doninha e rato-de-pelo-longo permaneceu viável após o congelamento a seco. Em todas as espécies, pronúcleos foram formados após a injeção de espermatozoides congelados a seco em oócitos de camundongos. Embora preliminares, esses resultados podem ser úteis para o futuro estabelecimento de “zoológicos liofilizados” para a conservação de animais selvagens (Kaneko et al., 2014).



Considerações finais

A coleta de sêmen ou esperma é essencial para o exame andrológico, para obter espermatozoides para inseminação artificial, fertilização *in vitro* (FIV), injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI), formação de bancos de reserva genômica, seleção de machos para programas reprodutivos, diagnóstico de casos de subfertilidade ou infertilidade e uso na pesquisa. O método de coleta por eletroejaculação (EE) é o mais comumente usado em felídeos selvagens. A utilização de vagina artificial requer o condicionamento prévio do animal e pode oferecer riscos à integridade física de quem coleta, mesmo com pequenos felídeos. Outros métodos vêm sendo descritos, como a cateterização uretral. Também a coleta do epidídimo, por punção, lavagem ou fatiamento (*slicing*), para obter material para pesquisa ou recuperar de machos que morreram há pouco tempo, têm sido descritas. A análise seminal é essencial para a avaliação da fertilidade em felídeos selvagens, mas algumas das técnicas utilizadas em outras espécies são difíceis ou impossíveis de serem utilizadas, devido ao mínimo volume do ejaculado dos pequenos felídeos, como por exemplo do gato-mato-pequeno e gato-maracajá.

Novos protocolos de criopreservação têm sido testados e validados, como por exemplo a substituição da gema de ovo por lecitina de soja e a liofilização do sêmen, com isso surgem novas possibilidades para a formação de bancos de reserva genômica.

Agradecimentos

O autor agradece a todos aqueles que participaram no desenvolvimento das atividades de pesquisa relacionadas à reprodução de animais silvestres, especialmente a toda a equipe da Itaipu Binacional, pelo suporte essencial para a execução desses projetos.

Referências

- Dooley MP, Pineda MH.** Effect of method of collection on seminal characteristics of the domestic cat. *Am J Vet Res*, v.47, p. 286-292, 1986.
- Dooley MP, Pineda MH, Hopper JG, Hsu WH.** Retrograde flow of spermatozoa into urinary bladder of cat during electroejaculation, collection of semen with an artificial vagina, and mating. *Am J Vet Res*, v.52, p. 687-691, 1991.
- Hay M, Goodrowe K.** Comparative cryopreservation and capacitation of spermatozoa from epididymis and vasa deferentia of domestic cat. *J Reprod Fertil Suppl*, v.47, p.297-305, 1993.
- Howard JG, Brown JL, Bush M, Wildt DE.** Teratospermic and normospermic domestic cats: ejaculate traits, pituitary-gonadal hormones, and improvement of spermatozoa motility and morphology after swim up processing. *J Androl*, v.11, p. 204-215, 1990.
- Kaneko T, Ito H, Sakamoto H, Onuma M, Inoue-Murayama M.** Sperm preservation by freeze-drying for the conservation of wild animals. *PLoS ONE*, v.9, p.e113381, 2014.
- Kheirkhah, MS, Mollapour Sisakht M, Mohammadsadegh M, Moslemi HR.** Sperm evaluation of Jungle Cat (*Felis chaus*) obtained by urethral catheterization (CT) after medetomidine administration. *Theriogenology*, v.91, p.17-20, 2017.
- Longley L.** Aging in large felids. In: *Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine*, v.7, Chapter 60, p.465-469, 2012.
- Longley L.** Aging in large felids. In: *Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine: Current Therapy*. Elsevier/Saunders, St Louis, MO; v.7, p.465-469, 2012.
- 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.
- Pineda MH, Dooley MP, Martin PA.** Long term study on the effects of electroejaculation o seminal characteristics of the domestic cat. *Am J Vet Res*, v.45, p.1038-1040, 1984.
- Scott P.** Cats. In: Hafez ES (Ed.), *Reproduction and breeding techniques for laboratory animals*, Lea and Febiger, Philadelphia, p.205, 1970.
- Sojka NJ.** Management of artificial breeding in cats. In: D.A. Morrow (Ed.), *Current therapy in theriogenology: diagnosis, treatment and prevention of reproductive diseases in large and small animals (2nd ed.)*, WB Saunders, Philadelphia, p.805-808, 1986.
- Sojka NJ, Jemings LL, Hamner CE.** Artificial insemination in the cat (*Felis catus* L.). *Lab Anim Care*, v.20, p. 198-204, 1970.
- Vansandt LM, Bateman HL, Newsom J, Swanson WF.** Getting the yolk out: The use of a soy lecithin-based cryomedium for semen banking in the Pallas' cat and fishing cat. *Reprod Fertil Dev*, v.29, p.165-166, 2016.