



Efeito de diferentes osmolaridades do diluidor Tris-citrato na congelação com etilenoglicol ou glicerol de espermatozoides epididimários de gato doméstico (*Felis catus*)

*Effect of different osmolarities of Tris-citrate extender on freezing epididymal sperm from domestic cat (*Felis catus*) with ethyleneglycol or glycerol*

Silmara Letícia Gonçalves Lima¹, Daniele Calado Brito, Juliana Gonçalves Lima, Marcela da Silva Cordeiro, Sheyla Farhayldes Souza Domingues

Universidade Federal do Pará, Laboratório de Biotecnologia da Reprodução e Medicina dos Animais da Amazônia, Castanhal, Pará, Brasil.

Resumo

Objetivou-se com o estudo investigar o efeito de diferentes osmolaridades do diluidor Tris-citrato em espermatozoides epididimários de gatos domésticos (*Felis catus*) e a congelação com glicerol ou etilenoglicol. Foram realizados dois experimentos, com 10 gatos. No Experimento 1, avaliou-se a manutenção dos parâmetros espermáticos em diluidor tris-citrato com osmolaridades 275, 325, 375, 425, 475 e 525 mOsm, nos tempos (T0= 0, T1= 30 e T2= 60 min). No Experimento 2 a congelação foi realizada utilizando as osmolaridades 325 e 375 do glicerol a 4% ou etilenoglicol a 3%, 6%. Dentre as osmolaridades, quanto à motilidade a 325 mOsm não diferiu estatisticamente com o fluido epididimal (controle) nos três tempos e a 375 mOsm no T0 e T1, e ambas não apresentaram diferenças estatísticas entre si e entre os tempos em todos os parâmetros espermáticos. O uso de 4% de glicerol em diluidor com 375 mOsm foi superior, apresentando motilidade de 25% ± 6, vigor 4, integridade de membrana plasmática de 48% ± 9, sem diferenças estatísticas com o resfriamento e na morfologia não foram encontradas diferenças estatísticas entre as duas osmolaridades. Portanto, o Tris-citrato com 325 e 375 mOsm entre as osmolaridades testadas e pós congelação com 375 mOsm e glicerol 4% manteve os parâmetros espermáticos.

Palavras-chave: criopreservação, cauda do epidídimo, felino.

Abstract

*The aim of this study was to investigate the effect of different osmotic potentials of Tris-citrate extender in epididymal spermatozoa of domestic cats (*Felis catus*), frozen with glycerol or ethyleneglycol. Two experiments were carried out, with ten cats. In the first experiment, the influence of extender with the osmolarity of 275, 325, 375, 425, 475 and 525 mOsm on sperm parameters were evaluated. In the second experiment, slow freezing was performed using glycerol at 4% or ethyleneglycol at 3% and 6% added to extender with 325 and 375 mOsm. Among the osmolarities, the motility at 325 mOsm did not differ statistically with epididymal fluid (control) at all times evaluated and at 375 mOsm at T0 and T1, and both showed no statistical differences between each other and between the times in all sperm parameters. Glycerol 4% added to extender with 375 mOsm was superior, presenting motility of 25% ± 6, vigor 4, plasma membrane integrity of 48% ± 9, without statistical differences with cooling and in morphology, no statistical differences were found between the two osmolarities. Therefore, 325 and 375 mOsm Tris-citrate between the osmolarities tested and after freezing with 375 mOsm and 4% glycerol maintained the sperm parameters.*

Keywords: *criopreservation, epididymis-tail, feline*

Introdução

A recuperação e congelação de espermatozoides provenientes da cauda do epidídimo são biotécnicas de reprodução que visam a formação de reservas genéticas de animais com alto valor zootécnico ou ameaçados de extinção e que porventura vieram à óbito (Chatdarong et al., 2009). Entretanto, o emprego de espermatozoides epididimários em técnicas de reprodução assistida ainda está em aprimoramento. Em se tratando do gato doméstico (*Felis catus*), essas biotécnicas podem ser de grande importância para a conservação de recursos genéticos de espécies felíneas selvagens

¹Correspondência: Silmaraleticia@gmail.com

Recebido: 26 de março de 2018

Aceito: 13 de setembro de 2019



ameaçadas de extinção, uma vez que o gato doméstico é o único felídeo que não está listado como ameaçado (Andrews et al., 2018), sendo, portanto, um importante modelo experimental, pela possibilidade de transpor protocolos bem-sucedidos para outras espécies felídeas (Rijsselaere e Van Soom, 2010).

Estudos empregando espermatozóides epididimários de gato doméstico em técnicas de reprodução assistida têm apresentado resultados promissores, tais como a manutenção de capacidade fecundante de espermatozoides descongelados, resultado comprovado por meio de produção *in vitro* de embriões, quando foi possível alcançar taxas de clivagens e blastocistos de 53% com 30%, respectivamente (Zambeliet al., 2008). Assim como *in vivo*, foi relatada uma taxa de concepção de 80% de fêmeas inseminadas artificialmente com espermatozóides epididimários submetidos à resfriamento e congelação (Toyonaga et al., 2011).

Entretanto, um dos fatores cruciais para a manutenção e viabilidade da célula espermática epididimária é a característica físico-química da solução diluidora. O processo de congelação promove alterações na osmolaridade celular, devido à exposição a meios hiperosmóticos decorrentes, resultando no efluxo de água com consequente desidratação da célula e possível influxo de íons (Guthrie et al., 2002; Wei Si et al., 2006) que levam, principalmente, à redução da motilidade espermática (Kunkitti et al., 2017). Quando essas células são submetidas a meios isosmóticos ou até mesmo hiposmóticos durante a descongelação, um rápido influxo de água resulta em injúrias físicas, como ruptura de membrana plasmática (Wei Si et al., 2006).

Portanto, as características osmóticas do diluidor podem apresentar grande importância para o sucesso da manutenção e viabilidade celular. Os espermatozóides no epidídimo estão em um meio hiperosmótico em comparação ao sêmen (Robaieret et al., 2006) e a maioria dos diluidores empregados em espermatozóides epididimários de gatos domésticos utilizam osmolaridade de 307 mOsm/L, similar à do sêmen (Glover & Watson, 1985; Emerenciano et al., 2013). Demonstra-se dessa forma, a necessidade de estudos que estabeleçam a osmolaridade do diluidor mais apropriada para a manutenção dos espermatozóides epididimários, bem como o efeito dessas soluções no sucesso da congelação quando associado com crioprotetores intracelulares, tais como o glicerol e etilenoglicol.

O glicerol, nas concentrações 4% ou 5%, é o agente crioprotetor intracelular mais utilizado na criopreservação de espermatozóides de gatos doméstico (Villaverde et al., 2013). O etilenoglicol possui uma alta capacidade crioprotetora, baixo peso molecular e uma rápida penetração celular, tendo sido empregado na criopreservação dos espermatozóides (Silva et al., 2012) em decorrência de sua menor toxicidade devido sua alta permeabilidade celular (Bhattacharya, 2018).

Objetivou-se com o presente trabalho investigar o efeito de diferentes osmolaridades do diluidor Tris-citrato acrescido de glicerol ou etilenoglicol na congelação de espermatozóides epididimários de gatos domésticos (*Felis catus*).

Material e Métodos

Coleta do complexo testículo-cauda do epidídimo

Os complexos testículo-cauda do epidídimo foram obtidos de dez gatos domésticos (n=10) durante procedimento rotineiro de orquiectomia no hospital veterinário do Campus Universitário de Castanhal (Universidade Federal do Pará) e teve aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Pará (CEUA/UFPA), Nº 1650060516.

Experimento I: Efeito de diferentes osmolaridades do diluidor Tris-citrato sobre a motilidade, vigor e integridade de membrana plasmática de espermatozóides da cauda do epidídimo.

Após a orquiectomia, os complexos testículo-epidídimo de cinco gatos foram imediatamente destinados ao laboratório em placas de Petri previamente esterilizadas, imersos em solução fisiológica (NaCl a 0,9%) pré-aquecida (37°C). Em seguida, foram dissecados para a retirada da cauda do epidídimo e a recuperação dos espermatozóides por meio das técnicas de fatiamento e flutuação, que consistem no fatiamento da cauda com auxílio de um bisturi em seguida é adicionado o diluidor sobre os fragmentos da cauda para a flutuação e recuperação dos espermatozóides (Cary et al., 2004).

Após o fatiamento, foi retirada uma amostra do fluido epididimário para o controle *a fresco*. Os fragmentos fatiados foram separados e colocados em seis microtubos tipo *ependorf* (1,5ml), que continham 1ml de Tris - citrato (Fração A), com as diferentes faixas de osmolaridades (275, 325, 375,



425,475 e 525 mOsm) obtidas por meio da adição de frutose ou de água ultrapura, para o ajuste da osmolaridade. Em seguida, as amostras foram incubadas em banho-maria a 37°C e avaliadas em três períodos (T0 = 0, T1= 30 e T2= 60 min). Posteriormente, foi realizada a avaliação microscópica das amostras, que no controle a fresco foi feita somente no tempo T0, uma vez que os parâmetros espermáticos não se mantêm sem a diluição, pois se trata de uma amostra do fluido epididimário.

Experimento II: Efeito do diluidor Tris-citrato com diferentes osmolaridades no processo de congelação de espermatozóides epididimários com glicerol ou etilenoglicol

Após o fatiamento da cauda do epidídimo de cinco gatos, foi retirada uma amostra do fluido epididimário de cada animal para o controle à fresco. E para a congelação, os espermatozóides foram recuperados das caudas do epidídimo e diluídos, considerando os melhores resultados do experimento I.

A congelação foi iniciada com a etapa de diluição. Os fragmentos fatiados de cada cauda do epidídimo de cada animal foram colocados em microtubos do tipo *eppendorf* (1,5ml), que continham 1,0 ml de Tris - citrato (Fração A) na melhor ou melhores osmolaridades, em seguida foram retiradas amostras com auxílio de pipetas para a etapa de resfriamento, executado em geladeira numa curva decrescente de temperatura de 37°C para 4°C em um intervalo de 90 minutos (0,4°C/min). Após o resfriamento, as amostras foram subdivididas em grupos: glicerol 4%; etilenoglicol 3% e etilenoglicol 6%. Os crioprotetores foram adicionados à Fração B (Fração A + 20% de gema de ovo) de cada grupo e esta foi adicionada as amostras na proporção 1:1 após o resfriamento das mesmas. Em seguida, as amostras foram envasadas em palhetas de 0,25 ml, lacradas com esferas metálicas de 1,7 mm e expostas ao vapor de nitrogênio (-60 C°) por 20 minutos antes de serem mergulhadas em nitrogênio líquido (-196 °C). Uma semana após a congelação, as amostras foram descongeladas em banho-Maria a 37°C por 30 segundos.

Avaliação microscópica dos parâmetros espermáticos

No experimento I, os espermatozoides foram avaliados quanto a motilidade, vigor e integridade de membrana plasmática, nos tempos T0, T1 e T2. A motilidade e o vigor espermático foram avaliados subjetivamente em microscópio óptico (modelo ECLIPSE E400, Nikon, Japão) e para a integridade de membrana plasmática, foram confeccionadas lâminas as quais foram coradas com 5µl eosina nigrosina a 1% em 5µl da amostra em uma lâmina previamente aquecida (37°C). A avaliação foi feita pela contagem do total de 200 espermatozoides em microscópio óptico, em cada tempo de cada osmolaridade.

No experimento II, foram realizadas as análises espermáticas de motilidade, vigor e integridade de membrana plasmática dos espermatozóides do fluido epididimário à fresco e após todas as etapas do processo de congelação (diluição, resfriamento e congelação), já descritas no experimento I. Também foi avaliada a morfologia espermática, tendo sido contados 200 espermatozoides por amostra em microscópio óptico (modelo ECLIPSE E400, Nikon, Japão), sendo estes classificados como normais ou com defeitos maiores localizados no acrossoma, cabeça e peça intermediria, ou seja, defeitos relacionados a espermatogênese; ou menores presentes na cauda espermática, que são relacionados à via ejaculatória ou manipulação após colheita (Blom, 1973). A concentração foi determinada após a recuperação dos espermatozoides e a diluição, como auxílio de câmara de Neubauer (Hirschmann EM techcolor, Estados Unidos), após diluição (1:100, v: v) das amostras solução formol salina tamponada.

Análise Estatística

Os testes estatísticos utilizados foram: moda, para estabelecer o vigor espermático analisado, em uma escala de 0-5; média \pm desvio padrão, para o percentual dos parâmetros espermáticos; *one-way* ANOVA, para comparação dos tempos em cada osmolaridade e entre os tratamentos das etapas de congelação, e *two-way* ANOVA para analisar diferenças entre as osmolaridades e os tempos entre si. Os valores foram considerados estatisticamente significantes quando $P < 0,05$.

Resultados

No Experimento I, foram avaliados os parâmetros de motilidade, vigor e integridade de membrana plasmática espermática nas diferentes osmolaridades e em três tempos de análise. Quanto a motilidade espermática no fluido epididimário a fresco (72 ± 22), não foram observadas diferenças



($P > 0.05$) em comparação com as osmolaridades 325 no T0 ($77\% \pm 15$) e T1 ($50\% \pm 36$) e T2 ($43\% \pm 38$) e com a 375 mOsm no T0 ($68\% \pm 17$) e T1 ($45\% \pm 23$) (Tab. 1). As amostras diluídas em meio com 325 e 375 mOsm foram significativamente superiores quando comparadas as demais osmolaridades, pois não apresentaram diferenças significativas entre si e em entre os tempos T0, T1 e T2 em todos os parâmetros avaliados (Tab. 1).

Durante o processo de congelação, foram congelados $4,2 \times 10^6 \pm 0,7$ de espermatozoides recuperados após a diluição nas osmolaridades testadas (325 e 375 mOsm). Após a descongelação, os resultados de motilidade e vigor utilizando glicerol 4% foram semelhantes aos observados nos espermatozoides refrigerados. Além disso, a osmolaridade de 375 mOsm com glicerol 4% também manteve a integridade de membrana plasmática durante todas as etapas desde a diluição e após a congelação e com o fluido epididimário (Tab. 2).

Após a congelação os grupos com etilenoglicol nas duas osmolaridades utilizadas, apresentaram redução significativa na motilidade e no vigor, em comparação com as etapas de diluição e resfriamento (Tab. 2). Todavia, com relação à avaliação da integridade de membrana plasmática, os espermatozóides congelados com etilenoglicol a 6% na osmolaridade de 375 mOsm e a 3% em ambas osmolaridades não apresentaram diferenças estatísticas significativas com o fluido epididimário a fresco e com as etapas de diluição e resfriamento das duas osmolaridades (Tab. 2).

Não foram observadas diferenças estatísticas significativas com relação às taxas de espermatozoides morfológicamente normais entre todas as etapas da congelação e nas duas osmolaridades utilizadas. Dentre as alterações morfológicas encontradas, com exceção da gota citoplasmática proximal, a maioria foi classificada como defeitos menores (Tab. 3).

Tabela 1: Média e Desvio padrão, dos parâmetros de Motilidade, Vigor e Integridade de Membrana Plasmática (ITM) dos espermatozóides da cauda do epidídimo de gatos domésticos nos tempos de incubação T0, T1 e T2, de acordo com as osmolaridades (275, 325, 375, 425, 475 e 525 mOsm) no diluidor Tris-citrato.

Tempo de Incubação	Osmolaridades	Parâmetros Espermáticos		
		%Motilidade	Vigor	%IMP
Fluido Epididimal (T0) 0min		72±21,7 ^{Aa}	5 ^A	-
	275	64±12 ^{Aa}	5 ^{Aa}	71±15 ^{Aa}
	325	77±15 ^{Aa}	5 ^{Aa}	56±29 ^{Aa}
	375	68±17 ^{Aa}	4 ^{Aa}	51±20 ^{Aa}
	425	60±23 ^{Aa}	4 ^{Aa}	57±34 ^{Aa}
	475	60±33 ^{Aa}	3 ^{Aa}	44±37 ^{Aa}
	525	57±22 ^{Aa}	4 ^{Aa}	45±30 ^{Aa}
(T1) 30min	275	42±8 ^{Bb}	4 ^{Aa}	45±25 ^{Ab}
	325	50±36 ^{Aa}	4 ^{Aa}	51±30 ^{Aa}
	375	45±23 ^{Aa}	4 ^{Aa}	49±32 ^{Aa}
	425	35±17 ^{Ba}	3 ^{Aa}	53±30 ^{Aa}
	475	39±27 ^{Ba}	3 ^{Aa}	47±25 ^{Aa}
	525	37±22 ^{Ba}	4 ^{Aa}	45±27 ^{Aa}
(T2) 60min	275	26±17 ^{Cc}	4 ^{Aa}	43±16 ^{Ab}
	325	43±38 ^{Aa}	4 ^{Aa}	56±24 ^{Aa}
	375	30±25 ^{Ba}	4 ^{Aa}	53±30 ^{Aa}
	425	32±22 ^{Ba}	4 ^{Aa}	47±29 ^{Aa}
	475	32±22 ^{Ba}	3 ^{Aa}	42±22 ^{Aa}
	525	28±17 ^{Ba}	4 ^{Aa}	47±26 ^{Aa}

A, B, C - Valores seguidos de letras maiúsculas indicam diferença estatística entre as diferentes osmolaridades e com o fluido epididimário dentro do mesmo tempo ($P < 0,05$), entre as linhas.

a, b - Valores seguidos de letras minúsculas indicam diferença estatística na mesmas osmolaridades e com o fluido epididimário entre os tempos T0, T1 e T2 ($P < 0,05$).



Tabela 2: Média e desvio padrão dos parâmetros de motilidade, vigor e integridade de membrana plasmática (ITM) dos espermatozoides da cauda do epidídimo de gatos domésticos no controle (fluido epididimário), nas osmolaridades de 325 e 375 mOsm e durante as etapas de diluição, resfriamento e congelação, com o emprego dos crioprotetores glicerol e etilenoglicol.

Etapa		Parâmetros Espermáticos		
		%Motilidade	Vigor	%ITM
Fluido Epididimário	-	90±10 ^A	5 ^A	84±10 ^A
Diluição	325	70±10 ^{AB}	5 ^A	70±14 ^A
	375	67±12 ^{AB}	5 ^A	70±21 ^A
Resfriamento	325	53±21 ^{BC}	5 ^{AB}	56±8 ^A
	375	50±17 ^{BC}	5 ^{AB}	62±17 ^A
Congelação	325 GL4%	28±17 ^C	3 ^{AB}	47±20 ^B
	325 EG 3%	7±2 ^D	2 ^{BC}	48±7 ^A
	325 EG6%	4±5 ^E	1 ^C	52±14 ^A
	375 GL4%	25±6 ^C	4 ^{AB}	48±9 ^A
	375 EG 3%	10±8 ^F	2 ^{BC}	42±11 ^B
	375 EG6%	8±5 ^G	2 ^{BC}	54±4 ^A

GL4%: Glicerol com diluidor na osmolaridade 325;

375 GL4%: Glicerol com diluidor na osmolaridade 375;

325EG3%: Etilenoglicol à 3% com diluidor na osmolaridade 325;

375EG3%: Etilenoglicol à 3% com diluidor na osmolaridade 375;

325EG6%: Etilenoglicol à 6% com diluidor na osmolaridade 325;

375EG6%: Etilenoglicol à 6% com diluidor na osmolaridade 375.

A,B,C - Valores seguidos de letras maiúsculas diferentes apresentam indicam diferença entre os tratamentos (P< 0,05), entre linhas da mesma coluna.

Tabela 3: Média e desvio padrão das alterações morfológicas dos espermatozoides da cauda do epidídimo de gatos domésticos no controle (fluido epididimário), nas osmolaridades de 325 e 375 mOsmol e durante as etapas de diluição, resfriamento e congelação, com o emprego dos crioprotetores glicerol e etilenoglicol.

Etapas		Morfologia Espermática					
		%MORF N	%CD	%CE	%CI	%G CP	%G CD
Fluido Epididimário	-	66±14 ^A	13±10 ^A	10±17 ^A	11±8 ^A	3±2 ^A	2±1 ^A
Diluição	325	53±12 ^A	29±5 ^{Aa}	4±3 ^{Aa}	13±8 ^{Aa}	1±0 ^{Aa}	-
	375	54±17 ^A	25±4 ^{Aa}	1±0 ^{Aa}	16±18 ^{Aa}	-	-
Resfriamento	325	47±16 ^A	25±6 ^{Aa}	5±1 ^{Aa}	19±14 ^{Aa}	1±0 ^{Aa}	2±0 ^{Aa}
	375	49±19 ^A	31±6 ^{Aa}	5±1 ^{Aa}	19±14 ^{Aa}	-	-
Congelação	325 GL4%	43±11 ^A	41±7 ^{Aa}	5±2 ^{Aa}	13±15 ^{Aa}	-	3±0 ^{Aa}
	325 EG3%	43±19 ^A	47±28 ^{Bb}	12±12 ^{Ab}	13±5 ^{Ab}	-	-
	325 EG6%	46±14 ^A	28±18 ^A	27±23 ^{Aa}	5±0 ^{Bb}	-	-
	375 GL4%	30±19 ^A	41±2 ^{Bb}	18±9 ^{Aa}	40±0 ^{Bc}	-	-
	375 EG3%	43±15 ^A	29±18 ^{Aa}	18±9 ^{Aa}	40±0 ^{Bc}	-	-
	375 EG6%	51±26 ^A	31±21 ^{Aa}	21±17 ^{Aa}	8±6 ^{Ab}	-	-

%MORF N: Morfologia normal espermática %CD: cauda dobrada, %CE: cauda enrolada, %CI: cabeça isolada, %GCP: gota citoplasmática distal e %GCD: gota citoplasmática distal.

325GL4%: Glicerol com diluidor na osmolaridade 325;

375GL4%: Glicerol com diluidor na osmolaridade 375;

325EG3%: Etilenoglicol à 3% com diluidor na osmolaridade 325;

375EG3%: Etilenoglicol à 3% com diluidor na osmolaridade 375;

325EG6%: Etilenoglicol à 6% com diluidor na osmolaridade 325;

375EG6%: Etilenoglicol à 6% com diluidor na osmolaridade 375.

A, B – Apresentam diferença estatística significativa com o controle entre as linhas.

a, b, c - Valores seguidos de letras minúsculas diferentes indicam diferença entre os tratamentos (P< 0,05), entre as linhas.



Discussão

O presente estudo propôs avaliar o efeito de diferentes osmolaridades em três tempos distintos do diluidor Tris-citrato sobre os parâmetros espermáticos para então proceder com a congelação dos espermatozoides da cauda do epidídimo, dessa forma foram utilizadas as osmolaridades de 325 e 375 mOsm que mantiveram os parâmetros espermáticos entre os tempos analisados.

Dessa forma, os resultados de motilidade após congelação utilizando o glicerol a 4% nas duas osmolaridades ($28\% \pm 17$ e $25\% \pm 6$, respectivamente) foram superiores quando comparados com outros estudos. Tsuitsui et al. (2003) e Macente et al. (2012), encontraram 23,7% e 24%, respectivamente, e com resultados semelhantes ao de (Chatdarong et al., 2009 e Buranaamnuay 2013). Em um estudo com sêmen Leões, utilizando um diluidor a Biladyl® e glicerol a 4% e 8%, foi encontrado cerca de 20% de motilidade e sugeriram que ainda são necessários outros estudos para melhorar as taxas de sobrevivência de espermatozoides do ejaculados de Leões (Stander-Breedtet al., 2004). Karjaet al. (2016), também observaram taxas de 20% de motilidade em sêmen de tigres com diluidor a base de gema de ovo e 6% de glicerol. Dessa forma, o estabelecimento de protocolos que aumentem a sobrevida dos espermatozóides em modelos experimentais, podem auxiliar na formação de bancos de germoplasma em felinos ameaçados de extinção.

No presente estudo em relação à integridade de membrana plasmática foram observados resultados de $47\% \pm 20$ e $48\% \pm 9$ das duas osmolaridades testadas e com o glicerol a 4%, foram superiores ao encontrado por Kashiwasakiet al. (2005), que obteve valores de 32,2%, com um meio diluente contendo 3% de glicerol e ao de Kunkittiet al. (2016) que obtiveram taxas de 43% com diluidor a base de TRIS e com glicerol a 3%, em espermatozóides epididimários de gatos domésticos. Esta diferença pode ser atribuída ao fato de que no presente trabalho foi utilizado um diluidor com osmolaridade mais adequada aos espermatozóides epididimários, fato que pode ter promovido redução do estresse osmótico, proporcionando assim melhores resultados dos parâmetros espermáticos avaliados. Um estudo por Kunkittiet al. (2017) mostrou que espermatozoides do epidídimo de gatos domésticos são altamente suscetíveis ao estresse osmótico, diminuem a motilidade drasticamente quando exposto às soluções com 75 mOsm e 600 mOsm e tem perda completa de motilidade em osmolaridades maiores que 900 mOsm.

Em relação à morfologia espermática, os resultados encontrados com o diluidor Tris-citrato nas duas osmolaridades em todas as etapas da congelação mostraram percentuais com mais de 43% de espermatozoides normais após a descongelação, quando comparado aos resultados de Tebet et al. (2006), que utilizaram o diluidor Tris-gema-Equex, estes autores mostraram que, após descongelação, 23% dos espermatozoides oriundos da cauda do epidídimo apresentaram-se morfologicamente normais. Demonstraram, mais uma vez, que o diluidor pode ter influenciado positivamente na diminuição das taxas de teratospermia. O diluidor Tris-citrato com osmolaridade mais adequada foi capaz de conservar o potencial osmótico dos espermatozóides epididimários de gatos domésticos, mantendo sua morfologia normal durante o processo de congelação.

É muito importante ressaltar que neste trabalho o ajuste da osmolaridade foi realizado com frutose e que a maior quantidade dessa substância no diluidor pode ter contribuído, fortemente, para a sobrevida dos espermatozoides, demonstrando que além de servir como fonte de energia (Hafez & Hafez, 2004), este açúcar pode apresentar um importante papel crioprotetor durante o processo de congelação. No entanto, ainda são necessários mais estudos que corroborem a importância da osmolaridade do diluidor, bem como a real influência da frutose no contexto da manutenção e criopreservação de espermatozóides epididimários de gatos domésticos.

Conclusão

O estabelecimento de um meio diluidor com um valor de osmolaridade ideal é de extrema importância para a manutenção e recuperação de espermatozóides epididimários. Com isso, mostrou-se que o diluidor Tris-citrato com as osmolaridades de 325 e 375 mOsm permite a obtenção de espermatozoides com boa qualidade, a manutenção dos parâmetros espermáticos, bem como a manipulação espermática durante uma hora sem alterar sua qualidade. Adicionalmente, o crioprotetor glicerol a 4% acrescido de 20% de gema de ovo na Fração A, na osmolaridade 375 mOsm foi considerado o mais viável para manutenção dos parâmetros espermáticos após congelação de espermatozóides epididimários de gatos domésticos.



Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento, ao grupo do Laboratório de Biotecnologia da Reprodução e Medicina dos Animais da Amazônia (BIOMEDAM), ao Hospital de Pequenos Animais da Universidade Federal do Pará (UFPA) e à Faculdade de Medicina Veterinária da UFPA, pelo amparo logístico.

Referências

- Andrews CJ, Thomas DG, Yapura J, Potter MA.** Reproductive biology of the 38 extant felid species: a review. *Mammal Review*, v.49, p.16–30, 2018.
- Bhattacharya S.** Cryoprotectants and their usage in cryopreservation process. *Cryopreservation biotechnology in biomedical and biological sciences*. doi:10.5772/intechopen.80477, 2018.
- Blom E.** Ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. *Nord Vet Med*, v.25, p.383-391, 1973.
- Buranaamnuay K.** Sperm-TALP: An alternative extender for retrieving and diluting epididymal sperm in the domestic cat. *Reprod Domest Anim*, v.48, n.6, p.912–917, 2013.
- Cary Ja, Madill S, Farnsworth K, Hayana JT, Duos L, Fahning A.** A comparison of electroejaculation and epididymal sperm collection techniques in stallion. *Can Vet J*, v.45, p.35–41, 2004.
- Chatdarong K, Thuwanut P, Suksamai P, Patanatriradaj S, and Sangwornrachasup A.** Survival of frozen-thawed cat spermatozoa pre-cooled in the epididymides. *Reprod Domest Anim*, v.44, p.377–380, 2009.
- Emerenciano KDM, Lima GL, Peixoto GCX, Silva MA, Oliveira MGC, DE Paula VV, Silva AR.** Recuperação de espermatozoides epididimários de gatos doméstico (*Felis catus*) utilizando soluções à base de Tris ou água de coco em pó. *Acta Vet Brasílica*, v.7, n.2, p.148-153, 2013.
- Glover T, Watson P.** The effect of buffer osmolality on the survival of cat (*Felis catus*) spermatozoa at 5°C. *Theriogenology*, v.24, p.449-455, 1985.
- Guthrie HD, Liu J, Critser JK.** Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. *Biol Reprod*, v.67, n.6, p.1811-1816, 2002.
- Hafez ESE, Hafez B.** Reprodução animal. 7.ed. São Paulo: Manole. Cap.30, p.441-442, 2004.
- Karja K, Ni Wayan, Mokhamad, F., Mohamad AS, Ligaya ITA, T, Retno S, TriHY, Huaso, MB, Ardyta W, Keni K, Tsukasa T, Zhao N, Masayasu T, Fuminori T, Tatsuya T, Kazuhiro K, Yoko S, Takeshige O.** Characteristics and fertility of sumatran tiger spermatozoa cryopreserved with different sugars. *Cryoletters*, v.37, p.264-271, 2016.
- Kashiwasaki N, Yamaguchi R, Uesugi R, Hishiyama N, Kim M, Nakatsukasa R, Kojima Y, Okuda Y, Hisamatsu S, Inomata T, Shinomura M.** Sperm motility, plasma membrane integrity, and binding capacity to homologous zona pellucida of cryopreserved epididymal spermatozoa in the domestic cat. *J Reprod Dev*, v.51, p.735-739, 2005.
- Kunkitti P, Axné E, Bergqvist AS, Sjunnesson Y.** In vitro fertilization using frozen-thawed feline epididymal spermatozoa from corpus and cauda regions. *Theriogenology*, v.86, n.6, p.1403–1408, 2016.
- Kunkitti P, Chatdarong K, Suwimonteerabutr J, Nedumpun, T, Johannisson, A, Bergqvist AS, Sjunnesson Y, Axné E.** Osmotic tolerance of feline epididymal spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, v.185, p.148-153, 2017.
- Macente BI, Mansano CFM, Pereira MM, Martins MIM, Gioso MM, Savi PAP, Gutierrez RR.** 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 Vet Brasílica*, v.6, n.2, p.112-117, 2012.
- Rijsselaere T, Van Soom A.** Semen collection, assessment and artificial insemination in the cat. *Vlaams Diergeneeskd Tijdschr*, v.79, p.467–470, 2010.
- Robaire BT, Hinton BT, Orgebin-crist MC.** The Epididymis. In: Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. 3ed. v.1, New York: Elsevier Academic Press, cap.1, p.3-54, 2006.
- Silva CB, Cajueiro FP, Silva VS, Guerra MP.** Crioprotetores etileno glicol ou acetamida na viabilidade in vitro de espermatozoides congelados de ovinos. *Ciência Rural*, v.42, p.6, 2012.
- Stander-Breidt H, Schwabach LMJ, Greyling JPC, Loskutoff NM.** Effect of different cryodiluents and thawing methods on the post-thaw motility of African Lion (*Panthera leo*) spermatozoa. *S Afr J Anim Sci*, v.34, p.74-76, 2004.
- Tebet JM, Martins MIM, Chirinea VH, Souza FF, Campagnol D, Lopes MD.** Cryopreservation effects on domestic cat epididymal versus electroejaculated spermatozoa. *Theriogenology*, v.66, p.1629–



1632, 2006.

Tsutsui T, Wada M, Anzai M, Hori T. Artificial insemination with frozen epididymal sperm in cats. *J Vet Med Sci*, v.65, p.397-399, 2003.

Toyonaga M, Sato Y, Sasaki A, Kaihara A, Tsutsui, T. Artificial insemination with cryopreserved sperm from feline epididymides stored at 4 °C. *Theriogenology*, v.76, n.3, p.532-537, 2011.

Villaverde AI, Fioratti EG, Penitenti M, Ikoma MR, Tsunemi MH, Papa FO, Lopes MD. Cryoprotective effect of different glycerol concentrations on domestic cat spermatozoa. *Theriogenology*, v.80, p.730-737, 2013.

Wei Si JD, Benson HM, John KC. Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on the motility, plasma membrane integrity and acrosomal integrity of rat sperm. *Cryobiology*, v.53, p.336-348, 2006.

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.
