



## Coleta e criopreservação de células espermáticas do epidídimo de cervo dama (*Dama dama*): relato de caso

*Fallow deer (Dama dama) epididymal sperm collection and cryopreservation: case report*

Antonio Henrique Kuczarski<sup>1</sup>, Carolina Fontana<sup>2</sup>, Luiz Felipe Souza de Lima<sup>1</sup>, Tathiana Ferguson Motheo<sup>3</sup>, Heitor José Bento<sup>1</sup>, Marisol Alves de Barros<sup>2</sup>, Regina Célia Rodrigues da Paz<sup>3</sup>, Roberto Lopes de Souza<sup>3</sup>

Pós-graduação em Ciências Veterinárias<sup>1</sup>, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, MT, Brasil; Hospital Veterinário da Universidade Federal de Mato Grosso<sup>2</sup>, Cuiabá, MT, Brasil; <sup>3</sup>Professor do Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, MT, Brasil.

### Resumo

O objetivo do presente relato foi avaliar a viabilidade da técnica de coleta de células espermáticas do epidídimo de um cervo dama (*Dama dama*) após orquiectomia e comparar sua capacidade de criopreservação utilizando dois diluidores comerciais diferentes, o Triladyl® e o Andromed®. Foram avaliados o volume testicular, a motilidade e vigor espermáticos e a morfologia das células espermáticas antes e após o processo de criopreservação. Ao se comparar os dois meios comerciais, pode-se constatar que a motilidade e vigor espermáticos foram melhores na alíquota congelada com Triladyl® (25% e 2) do que com Andromed® (10% e 1). Quanto a morfologia espermática os dois diluidores apresentaram valores semelhantes de defeitos totais (32.5% com Andromed® e 33% com Triladyl®, sendo a cabeça lanciforme o defeito predominante em ambos os casos). Diante desses resultados, a técnica de coleta de células espermáticas do epidídimo é viável para cervídeos Dama e mais estudos são necessários para se estabelecer o melhor meio diluidor para esta espécie criada em climas tropicais.

**Palavras-chave:** cervídeo, biobanco, epidídimo.

### Abstract

*The aim of the present report was to evaluate the viability of epididymal sperm collection technique in a fallow deer (Dama dama) after orchietomy and to compare its cryopreservation capacity using two different commercial extenders, Triladyl® and Andromed®. Thus, testicular volume, sperm motility and vigor, and sperm cell morphology were evaluated before and after the cryopreservation process. When comparing the two commercial media, sperm motility and vigor were better in the post-thawed aliquot extended with Triladyl® (25% and 2) than with Andromed® (10% and 1). Regarding sperm morphology, the two dilutors presented similar values of total defects (32.5% with Andromed® and 33% with Triladyl®, with the lanciform head being the predominant defect in both cases). Given these results, the epididymal sperm cell collection technique is viable for Dama cervids and further studies are needed to establish the best extender for this species raised under tropical conditions.*

**Keywords:** cervid, biobank, epididymis.

### Introdução

O cervo dama (*Dama dama*) é um animal nativo da Europa e é muito visado tanto para caça como *pet* (Masseti e Mertzaniidou, 2008). O desenvolvimento e a utilização de biotécnicas reprodutivas em animais selvagens, como criopreservação de gametas, possibilitam o avanço na formação de bancos genéticos e consequente conservação de espécies ameaçadas (Fickel et al., 2007). Em cervídeos, a coleta e a criopreservação seminal objetivam tanto a conservação como o aumento das populações em áreas agrícolas e de caça (Bóveda et al., 2018). Dessa forma, o objetivo do presente relato foi descrever a técnica de coleta de células espermáticas do epidídimo em um cervo dama criado em clima tropical e comparar o perfil espermático após criopreservação com dois meios diluidores comerciais, um com gema de ovo (Triladyl®) e o outro sem (Andromed®) que possibilita a transferência de material genético

<sup>1</sup>Correspondência: ah.kucz@gmail.com

Recebido: 03 de junho de 2019

Aceito: 08 de outubro de 2019

internacional sem riscos de embargos por contaminação biológica da gema de ovo.

### Material e Métodos

Foi encaminhado ao Hospital Veterinário da Universidade Federal de Mato Grosso, um macho jovem de cervo Dama (*Dama dama*) de aproximadamente 110 kg com histórico de claudicação no membro pélvico direito. Após a realização de exame radiográfico do membro foi constatado fratura completa da tíbia. Sendo assim, foi realizada a correção cirúrgica com fixadores externos e tala para estabilização da fratura. Porém, após 48 horas foi observado sangramento e mobilidade da mesma, sendo realizada a amputação do membro. Devido ao temperamento agressivo do animal durante a estação reprodutiva e a impossibilidade de monta natural, foi realizada a orquiectomia. O presente relato possui licença SISbio de identificação:12181496.

Os testículos excisados foram alocados em recipiente plástico estéril contendo solução de 0,9% NaCl à 37°C. Ato contínuo, foram mensurados largura e comprimento testicular por meio de paquímetro eletrônico e o volume testicular foi determinado pela fórmula de esferoide prolato (Gosch e Fischer, 1989). Após 1 hora, procedeu-se a dissecação de vasos e tecidos isolando a cauda do epidídimo e o ducto deferente de ambos os testículos. A recuperação das células espermáticas foi realizada por meio de compressão da cauda do epidídimo (Savi et al., 2015) em placa de *Petri* contendo 200µL de ringer simples. As células espermáticas foram armazenadas em microtubo e mantidas aquecidas à 37°C até análise.

A motilidade e vigor espermáticos foram subjetivamente determinados por meio de microscópio óptico (X 400). A motilidade (0 a 100%) foi estimada em incrementos de 5%, já o vigor foi pontuado em uma escala de 1 (movimento exclusivamente oscilatório) a 5 (movimento muito rápido, linear e progressivo). Uma alíquota da amostra coletada (2µL) foi diluída em solução de formol salino tamponado (1:20) para a avaliação da concentração espermática em câmara de Neubauer e da morfologia das células espermáticas por meio de preparações em câmara úmida sob microscópio de contraste de fase (X 1000). Foram contadas 200 células, as quais foram classificadas como normais ou com defeitos de acrossoma, cabeça, peça intermediária ou cauda.

A integridade da membrana plasmática dos espermatozoides foi avaliada por meio da coloração de eosina-negrosina (membrana plasmática intacta – ausência de coloração; membrana plasmática danificada - células coradas) (Campbell et al. 1956), a integridade da membrana acrossomal foi avaliada através da coloração Fast Green/Bengal Rose (membrana intacta: acrossoma corado; membrana lesionada – acrossoma não corado) (Pope et al., 1991). Para cada coloração foi utilizado 2µL de amostra e o mesmo volume de corante (1:1). Estes foram homogeneizados sobre lâminas de vidro pré-aquecidas e em seguida foram confeccionados esfregaços, nos quais foram analisados sob microscopia óptica (X 400) avaliando 200 células por lâmina (Figura 1).

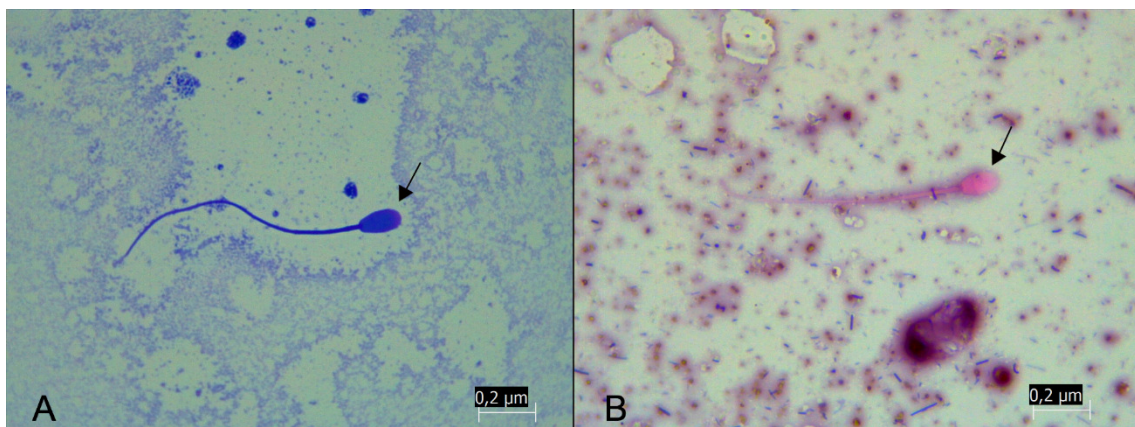


Figura 1: Espermatozoides de cervo dama (*Dama dama*) coletados através da compressão da cauda do epidídimo corados com Fast-green/Bengal rose (A) e eosina-negrosina (B) durante avaliação da integridade de membrana acrossomal e membrana plasmática, respectivamente.



Após as avaliações, a amostra foi dividida em duas alíquotas de 115  $\mu\text{L}$  e cada uma foi ressuspendida com o mesmo volume de Triladyl® ou Andromed® à 37°C. Estas foram envasadas em palhetas de 0,25 mL com concentração de  $4,5 \times 10^6$  spz/mL e em seguida refrigeradas em geladeira à 4 °C por 2 horas. Após este período, as palhetas foram colocadas em vapor de nitrogênio por 30 minutos e imersas em nitrogênio líquido. Por fim, estas foram armazenadas em botijão criogênico até análise (Jabbour et al., 1993). Uma palheta de cada grupo foi descongelada em banho maria à 37° C por 30 segundos e foram realizadas as mesmas avaliações descritas previamente.

### Resultados e discussão

O volume testicular direito foi de 359.19 mm<sup>3</sup> e esquerdo foi de 291.67 mm<sup>3</sup>. Foi recuperado um total de 0,23 mL de células espermáticas diluídas em Ringer simples e a concentração final obtida foi de  $18,25 \times 10^6$  spz/mL. As características seminais pré e pós criopreservação encontram-se descritas na tabela 1.

Tabela 1: Motilidade, vigor, viabilidade, integridade acrossomal e morfologia de células espermáticas recuperadas do epidídimo de cervo dama (*Dama dama*) antes e após o processo de criopreservação.

	Pré congelamento	Andromed®	Triladyl®
<b>Motilidade (%)</b>	70	10	25
<b>Vigor (1-5)</b>	3	1	2
<b>Viabilidade (%)</b>	76	16	4.5
<b>Integridade acrossomal (%)</b>	70.5	39	69
<b>Morfologia espermática</b>			
<b>Defeitos de cabeça</b>			
Cabeça lanciforme	11	32	39
Cabeça solta normal	0	0	1
<b>Defeitos de peça intermediária</b>			
Peça intermediária curvada	5	3	3
Peça intermediária fortemente dobrada	0	3	0
Implantação abaxial	2	0	0
Peça intermediária fraturada	2	0	0
Gota proximal	12	4	2
Gota distal	7	1	5
<b>Defeitos de cauda</b>			
Cauda dobrada na porção terminal	3	3	3
Cauda fortemente enrolada com peça intermediária	5	8	1
Cauda fraturada	0	0	1
Cauda fortemente dobrada	12	6	8
Cauda enrolada na cabeça	1	0	0
Cauda enrolada	1	0	0
Cauda fortemente dobrada com gota proximal	1	0	0
Cauda dobrada simples	0	4	3
DAG	0	1	0
<b>Total</b>	62	65	66
<b>%</b>	31%	32,5%	33%

Apesar da diminuição na qualidade das células espermáticas após a criopreservação, é viável o armazenamento de material genético *ex-situ* da espécie em questão utilizando dois diluidores comerciais diferentes disponíveis no mercado.



A diminuição na qualidade espermática é esperada após a criopreservação, porém foi observado uma maior diminuição neste relato quando comparado a outros descritos na literatura utilizando diluidor com base tris-glicerol-gema de ovo (Bóveda et al., 2018). Isso pode ser explicado pela diferença do ambiente onde o animal estava quando comparado ao habitat natural, que apresenta diferentes temperaturas e fotoperíodos, influenciando diretamente na secreção de LH e testosterona interferindo na quantidade e na qualidade dos espermatozoides (Asher et al., 1996).

Deve ser observado que as respostas aos protocolos de criopreservação são espécie específicos devido às proporções colesterol:fosfolípido na membrana plasmática, a tolerância osmótica e a fluidez da membrana plasmática. Ocorrendo alterações morfológicas principalmente na cabeça, demonstrado em diferentes espécies de ruminantes (Esteso et al., 2006; Hidalgo et al., 2007; Pradiee et al., 2016; Bóveda et al., 2018) corroborando com o encontrado neste relato onde a maior proporção de defeitos morfológicos foram de cabeça.

A busca por substâncias alternativas à produtos de origem animal em meios diluidores para criopreservar células espermáticas levou à utilização de lecitina de soja, um crioprotetor extracelular semelhante à gema de ovo por ambas conterem fosfatidilcolina que previne o estresse térmico (Bencharif et al., 2010). A viabilidade observada concorda com o descrito na literatura em bovinos (Masoudi et al., 2016), apresentando uma maior taxa de membranas plasmáticas integras utilizando Andromed<sup>®</sup> quando comparado ao Triladyl<sup>®</sup> apresentando assim um maior efeito protetor diminuindo a ocorrência de lesões em organelas intracelulares.

Até a realização desse trabalho não foi encontrado relatos da utilização de diluidores à base de lecitina de soja como alternativa à gema de ovo para criopreservar células espermáticas de cervo dama (*Dama dama*) e nem estudos caracterizando a qualidade espermática da espécie em questão em regiões de clima tropical quando coletado diretamente do epidídimo.

### Considerações finais

Afirmamos que a técnica utilizada foi eficaz para a coleta de células espermáticas e ambos os diluidores utilizados são funcionais para criopreservar o material genético do epidídimo de cervo *Dama* mantidos fora de seu país originário. O fato da coleta poder ser executada após orquiectomia ou *post mortem* corrobora para o desenvolvimento de novas pesquisas voltadas para conservação das espécies através da aplicação de biotecnologias reprodutivas em cervídeos criados e/ou mantidos em regiões neotropicais. Estudos para determinação de protocolos e meios de diluição mais adequados para a criopreservação ainda se faz necessário para melhor eficiência do processamento.

### Referências

- Asher GW, Berg DK, Beaumont S, Morrow CJ, O'Neill KT, Fisher MW. Comparison of seasonal changes in reproductive parameters of adult male European fallow deer (*Dama dama dama*) and hybrid Mesopotamian x European fallow deer (D. d. mesopotamica x D. d. dama). Anim Reprod Sci, v.45, p.201-215, 1996.
- Bencharif D, Amirat-Briand L, Garand A, Anton M, Schmitt E, Desherces S, Delhomme G, Langlois ML, Barrière P, Destrumelle S, Vera-Munoz O, Tainturier D. Freezing canine sperm: Comparison of semen extenders containing Equex<sup>®</sup> and LDL (Low Density Lipoproteins). Anim Reprod Sci, v.119, p.305-313, 2010.
- Bóveda P, Esteso MC, Castaño C, Toledano-Díaz A, López-Sebastián A, Muñiz A, Prieto P, Mejía, O, Ungerfeld R, Santiago-Moreno, J. Slow and ultra-rapid freezing protocols for cryopreserving mouflon (*Ovis musimon*) and fallow deer (*Dama dama*) epididymal sperm. Anim Reprod Sci, v.192, n.2, p.193-199, 2018.
- Campbell RC, Dott HM, Glover TD. Nigrosin eosin as a stain for differentiating live and dead spermatozoa. J Agr Sci, v.48, n.1, p.1-15, 1956.
- Esteso MC, Soler AJ, Fernández-Santos MR, Quintero-Moreno AA, Garde JJ. Functional significance of the sperm head morphometric size and shape for determining freezability in Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal sperm samples. J Androl, v.27, p.662-670, 2006.
- Fickel J, Wagener A, Ludwig A. Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. Eur J Wildlife Res, v.53, n.2, p.81-89, 2007.



- Gosch B, Fischer K.** Seasonal changes of testis volume and sperm quality in adult fallow deer (*Dama dama*) and their relationship to the antler cycle. *Reproduction*, v.85, n.1, p.7–17, 1989.
- Hidalgo M, Rodríguez I, Dorado JM.** The effect of cryopreservation on sperm head morphometry in Florida male goat related to sperm freezability. *Anim Prod Sci*, v.100, p.61-72, 2007.
- Jabbour HN, Veldhuizen FA, Green G, Asher GW.** Endocrine responses and conception rates in fallow deer (*Dama dama*) following oestrous synchronization and cervical insemination with fresh or frozen-thawed spermatozoa. *J Reprod Fertil*, v.98, n.2, p.495–502, 1993.
- Masoudi R, Sharafi M, Zareh Shahneh A, Towhidi A, Kohram H, Esmacili V, Shahverdi A, Davachi ND.** Fertility and flow cytometry study of frozen-thawed sperm in cryopreservation medium supplemented with soybean lecithin. *Cryobiology*, v.73, p.69-72, 2016.
- Masseti M, Mertzaniidou D.** *Dama dama*. The IUCN Red List of Threatened Species, 2008.
- Pope CE, Zhang YZ, Dresser BL.** A simple staining method for quantifying the acrosomal status of cat spermatozoa. *J Zoo Wildlife Med*, v.22, n.1, p.87–95, 1991.
- Pradice J, O'Brien E, Estes MC, Castaño C, Toledano-Díaz A, Lopez-Sebastián A, Marcos-Beltrán JL, Vega RS, Guillamón FG, Martínez-Nevado E, Guerra R, Santiago-Moreno, J.** Effect of shortening the prefreezing equilibration time with glycerol on the quality of chamois (*Rupicapra pyrenaica*), ibex (*Capra pyrenaica*), mouflon (*Ovis musimon*) and aoudad (*Ammotragus lervia*) ejaculates. *Anim Reprod Sci*, v.171, p.121-128, 2016.
- Savi PAP, Motheo TF, Padilha-Nakaghi LC, Pires-Buttler E, Vicente RR.** Técnica modificada de compressão do ducto deferente e cauda do epidídimo para obtenção de espermatozoides caninos. *Investigação*, v.14, n.1, p.18–22, 2015.
-