

TÉCNICAS REPRODUTIVAS, CRIOPRESERVAÇÃO ESPERMÁTICA E COLETA DE SÊMEN EM FELINOS SELVAGENS VISANDO À CONSERVAÇÃO – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Felipe Alexandre CATARDO¹

Saara SCOLARI²

Suzana MÁS-ROSA²

RESUMO

As técnicas de reprodução assistida (TRAs) como a inseminação artificial (IA), fertilização *in vitro* (FIV), transferência de embrião (TE) e a criopreservação de espermatozoide são de fundamental importância para que a variabilidade genética dos felinos selvagem de cativeiro não seja perdida, tal fato está diretamente ligado à conservação dessas espécies. Embora a criopreservação ainda seja um grande desafio devido a queda na qualidade espermática, essa tecnologia possibilita a utilização dos gametas masculinos por um período relativamente longo ou indeterminado, reduz riscos e custos com aquisição e transporte de reprodutores, além de favorecer rápida distribuição do material genético entre locais distantes.

Palavra-chave: Biotecnologia, Criopreservação, Felinos Selvagens, Reprodução Assistida.

ABSTRACT

Assisted reproduction techniques (ART), artificial insemination (AI), in vitro fertilization (IVF), embryo transfer (ET) and cryopreservation of spermatozoa are of fundamental importance for the genetic variability of wild felines of captivity not to be. This fact is directly related to the conservation of these species. Although cryopreservation is still a major challenge due to a decrease in sperm quality, this technology allows male gametes to be used for a relatively long or indeterminate period, reduces risks and costs with the acquisition and transport of breeding stock, and favors rapid distribution of genetic material between distant locations.

Keywords: Biotechnology, Cryopreservation, Wild Cats, Assisted Reproduction.

¹Discente do curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Ensino Superior e Formação Integral – FAEF, GARÇA-SP – BRASIL. E-mail: fecatardo@gmail.com (14) 99125-2038

²Docente do curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Ensino Superior e Formação Integral – FAEF, GARÇA-SP – BRASIL. E-mail: saarascolari1@yahoo.com.br E-mail: suzana_masrosa@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

Os felinos selvagens, principalmente os grandes felinos geralmente são vistos como ídolos, ou espécies de bandeira que simbolizam o ecossistema. Para que as técnicas de reprodução assistida (TRAs) possam desempenhar um papel significativo na conservação de felídeos, é interessante que as técnicas fundamentais de inseminação artificial (IA), fertilização in vitro (FIV), transferência de embrião (TE), além da criopreservação de espermatozoide e embriões sejam completamente desenvolvidas via estudo (MOREIRA, N. 2017).

A maioria das populações felinas em cativeiro tem poucos animais reprodutores, resultando em baixa variabilidade genética, com consequências reprodutivas negativas (RALLS et al., 1979, WILDT et al., 1987).

A expectativa de vida de felinos selvagens é curta e a produção de filhote para a espécie é consideravelmente baixa (1-4 filhotes/ninhada), e início precoce da senescência reprodutiva (~ 7-10 anos de idade), desse modo, as populações geneticamente viáveis em cativeiro são de difícil manutenção. Considera-se que o grau de ameaça à maioria das populações de felídeos selvagens é crescente, tornando-se necessário a aplicação de esforços conjuntos e interdisciplinares na sua conservação. As técnicas de reprodução assistida servem como uma importante solução ao enfrentar os desafios de manejo, e, com isso poderá auxiliar na conservação dessas espécies (MOREIRA, N., 2017).

A manutenção da variabilidade genética está diretamente ligada à conservação das espécies (WILDT, 1992; LEIBO e SONGSASEN, 2002). O número de espécies exemplares e a disposição geográfica dos felinos selvagens em cativeiro são fatores limitantes na pesquisa, por esse motivo, o gato doméstico desempenha um papel importante como modelo experimental para a compreensão da fisiologia reprodutiva e o

¹Discente do curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Ensino Superior e Formação Integral – FAEF, GARÇA-SP – BRASIL. E-mail: fecatardo@gmail.com (14) 99125-2038

²Docente do curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Ensino Superior e Formação Integral – FAEF, GARÇA-SP – BRASIL. E-mail: saarascolari1@yahoo.com.br E-mail: suzana_masrosa@yahoo.com.br

uso das biotecnologias reprodutivas nos felídeos selvagens (GOODROWE et al., 1989; SWANSON e WILDT, 1997; PUKAZHENTHI et al., 2001). Os gatos domésticos (*Felis catus*) são considerados animais de companhia e tornaram-se o primeiro modelo experimental de aproximadamente 36 espécies de felinos selvagens ameaçados de extinção. Estudos têm demonstrado que há influencia sazonal sobre a espermatogênese de felinos domésticos, porém estes são capazes de produzir espermatozoides viáveis, com motilidade espermática progressiva durante todo o ano (SPINDLER e WILDT, 1999; MARTINS et al., 2011).

São consideradas como técnicas reprodutivas para a conservação dos felinos selvagens todos os manejos reprodutivos, que envolvem a monta natural, algumas orientações para acasalamento e produção de filhotes. As técnicas de reprodução assistida (TRAs) são a inseminação artificial (IA), fertilização *in vitro* (FIV), transferência de embrião (TE) e a criopreservação de espermatozoide e embriões (MOREIRA, N., 2017).

DESENVOLVIMENTO

CRIOPRESERVAÇÃO

A criopreservação surgiu a partir do resultado da criobiologia que estuda compostos ou sistemas biológicos submetidos a temperaturas inferiores às fisiológicas. A criopreservação é a tecnologia por meio da quais células, tecidos ou embriões são preservados à temperaturas abaixo do ponto de congelamento da água, tendo como premissa a preservação da composição e da viabilidade das células por tempo indefinido (SILVA, S. V.; GUERRA, M. M. P., 2011).

¹Discente do curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Ensino Superior e Formação Integral – FAEF, GARÇA-SP – BRASIL. E-mail: fecatardo@gmail.com (14) 99125-2038

²Docente do curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Ensino Superior e Formação Integral – FAEF, GARÇA-SP – BRASIL. E-mail: saarascolari1@yahoo.com.br E-mail: suzana_masrosa@yahoo.com.br

A criopreservação de sêmen em felinos ainda é um grande desafio, devido à queda inaceitável na qualidade do sêmen após a descongelação, devido aos danos causados na membrana plasmática e acrossomal, principalmente se considerarmos que muitos animais são teratospérmicos, isto é, possuem alta porcentagem (>60%) de espermatozoides defeituosos (WOOD et al., 1993; PUKAZHENTHI et al., 1999, 2001; LEIBO e SONGSASEN, 2002; PENFOLD et al., 2003)

O processo de criopreservação espermática, além de possibilitar sua utilização por período relativamente longo (refrigeração) ou indeterminado (congelação), reduz riscos e custos com aquisição e transporte de reprodutores, além de favorecer rápida difusão de material genético entre locais distantes (CASTELO et al., 2008)

Dois métodos de criopreservação de sêmen são utilizados: a refrigeração e o congelamento. A refrigeração consiste em manter o sêmen a 4 ou 5 ° C, após a diluição em meio extensor (HARRIS et al., 2002). Este é o método indicado para uso em biotecnologias reprodutivas, quando o transporte de sêmen pode ser em questão de horas ou mesmo alguns dias. O congelamento de esperma em nitrogênio líquido é o segundo método, é a forma de armazenamento de escolha para integrar o Banco de Recursos Genéticos. O sêmen congelado tem um grande potencial de conservação, pois pode ser armazenado indefinidamente e transportado a qualquer distância para uso em biotecnologias reprodutivas (MARTINS, M. I. M; JUSTINO, R. C., 2015).

É necessário o conhecimento da resposta de células espermáticas felinas às várias condições estressantes da criopreservação para a formulação de protocolos de congelação mais adequado. A determinação da força de centrifugação, taxas de refrigeração e de congelamento, concentrações de crioprotetores, tipos de diluentes e técnicas de armazenamento mais adequados também são importante para a preservação bem sucedidas dessas células (MARTINS, M. I. M; JUSTINO, R. C., 2015).

O sêmen de felídeos não domésticos tem sido congelado no meio de congelação a base de gema de ovo. No entanto, a inclusão de gema de ovo é problemática,
¹Discente do curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Ensino Superior e Formação Integral – FAEF, GARÇA-SP – BRASIL. E-mail: fecatardo@gmail.com (14) 99125-2038

²Docente do curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Ensino Superior e Formação Integral – FAEF, GARÇA-SP – BRASIL. E- mail: saarascolari1@yahoo.com.br E- mail: suzana_masrosa@yahoo.com.br

resultando em possível variação entre partidas ou lotes na produção, contaminação microbiana e possíveis restrições regulamentares relacionadas ao transporte internacional de sêmen (MOREIRA, N., 2017).

Outro 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*) foram testado por Vansandt et al. (2016). Os resultados foram semelhantes com relação à porcentagem de clivagem de embriões, isso afirma 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.

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).

Infelizmente, o sucesso da técnica de criopreservação do sêmen de felídeos ainda é relativamente baixa (SWANSON, 2006). A criopreservação de sêmen é um processo que promove grande estresse celular e impõe aos espermatozoides condições extremamente desfavoráveis à manutenção de sua viabilidade (PURDY, 2006). Alta porcentagem de espermatozoide perde funções e motilidade após o descongelamento devido ao dano gerado no processo de congelamento, e a taxa de recuperação de motilidade após o descongelamento é <50% na maioria dos mamíferos (WALTON, 2000). Logo, preservar a qualidade do sêmen após criopreservação pode ter efeito

¹Discente do curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Ensino Superior e Formação Integral – FAEF, GARÇA-SP – BRASIL. E-mail: fecatardo@gmail.com (14) 99125-2038

²Docente do curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Ensino Superior e Formação Integral – FAEF, GARÇA-SP – BRASIL. E-mail: saarascolari1@yahoo.com.br E-mail: suzana_masrosa@yahoo.com.br

desfavoráveis no sucesso da reprodução assistida (MOREIRA, N., 2017). Durante o processo de criopreservação, a célula espermática é exposta a inúmeros fatores estressantes, que podem estar ligados ao choque térmico durante o resfriamento do sêmen, à formação de cristais intracelulares de gelo ou ao choque osmótico durante a congelação e descongelação, ou ainda ao estresse ligado à adição e ação do crioprotetor (WATSON, 2000).

A adição dos agentes crioprotetores ao meio diluente é essencial para a sobrevivência das células espermáticas, pois promovem alterações das propriedades físicas da solução, minimizando os efeitos do processo de congelação/dcongelação, embora essas substâncias possam causar danos às células os agentes crioprotetores dependendo de seu peso molecular podem penetrar ou não a membrana plasmática (WATSON, 2000; HOLT, 2000B). O crioprotetor mais utilizado para os felídeos selvagens é denominado de glicerol, promove proteção às células das consequências da cristalização ao aumentar a fração de água não congelada no meio extracelular (SOUZA, D. et al., 2013)

COLETA DE SÊMEN

Na coleta de sêmen o ejaculado deve fornecer motilidade e concentrações espermáticas adequadas, causando o menor estresse possível ao animal. Em espécies consideradas de companhia como: suínos, equinos, caprino, ovino e bovinos, o uso de uma vagina artificial permite que a coleta do ejaculado seja de boa qualidade. Porém, quando se trata de animal selvagem, em específico os felinos que apresenta temperamento de predador e alto risco associado para o coletor, esse método raramente pode ser empregado, há relatos da utilização desse com guepardos habituados ao ser humano. Mesmo nos felinos domésticos há relatos que eles só permitem a coleta ocasionalmente utilizando a vagina artificial por determinadas pessoas que já estão acostumados (MOREIRA, N., 2017).

¹Discente do curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Ensino Superior e Formação Integral – FAEF, GARÇA-SP – BRASIL. E-mail: fecatardo@gmail.com (14) 99125-2038

²Docente do curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Ensino Superior e Formação Integral – FAEF, GARÇA-SP – BRASIL. E-mail: saarascolari1@yahoo.com.br E-mail: suzana_masrosa@yahoo.com.br

O método de eletroejaculação para a coleta de sêmen em felinos selvagens é o mais utilizado (SCOTT e CATS, 1970), ou a no gato doméstico a vagina artificial (SOJKA et al., 1970). Os dois métodos permitem que a coleta total de sêmen seja de boa qualidade e que ambos poderão ser utilizado para propósitos diferentes. O espermatozoide também pode ser coletado por lavagem ou fatiamento (slicing) do epidídimo (HAY e GOODROWE, 1993), ou outra técnica denominada de cateterização uretral.

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

Para felídeos selvagens e domésticos, a eletroejaculação (EE) é o método mais comum para coleta de sêmen. No entanto, adquirir o equipamento eletroejaculador pode ser inviável pelo valor, existe o risco de contaminação por urina e os animais apesar de estarem sob efeito da anestesia geral, podem apresentar fortes contrações musculares (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 ± 2961 com motilidade de $89 \pm 13\%$, com uma concentração espermática média de $1,94 \times 10^9$ /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).

¹Discente do curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Ensino Superior e Formação Integral – FAEF, GARÇA-SP – BRASIL. E-mail: fecatardo@gmail.com (14) 99125-2038

²Docente do curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Ensino Superior e Formação Integral – FAEF, GARÇA-SP – BRASIL. E-mail: saarascolari1@yahoo.com.br E-mail: suzana_masrosa@yahoo.com.br

Espermatozoides coletados diretamente do epidídimo (especialmente da cauda do epidídimo) por compressão (*squeezing*) ou fatiamento (*slicing*) são usados geralmente para pesquisa com o objetivo de obter gametas masculinos após a morte do animal ou após a orquiectomia. A fim de saber a fertilidade dos machos a avaliação do sêmen é essencial, mas tem sido superficial, devido à dificuldade em obter sêmen, tanto quanto seu pequeno volume em pequenos felídeos (MOREIRA, N., 2017).

A eletroejaculação é preferida devido a não precisar de uma fêmea no estro ou não precisar que os machos sejam submetidos a treinamento, por isso, pode ser realizada em qualquer macho que não corra risco ao ser anestesiado (SOJKA, 1986). Alguns estudos reportaram os efeitos da voltagem, coleta sequencial, coleta durante longo período e fluxo retrógrado nas características seminais. Há variação considerável entre as espécies 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).

O protocolo de estímulos elétricos mais utilizado consiste em três séries de estímulos (30, 30 e 20) de 2 a 6 volts, com descanso entre as séries de 5 min. O equipamento utilizado deve ser adaptado para a espécie, com voltagem máxima de 12V e probes retais que variam de acordo com o porte do animal (HOWARD et al., 1990). Diferentes protocolos anestésicos como a cetamina isolada ou associada com a medetomidina, ou protocolos com associação de zolazepan, tiletamina e morfina também são descritos (MARTINS et al., 2011; SILVA et al., 2011; ACKERMANN et al., 2013).

A eletroejaculação pode ter efeito benéfico no caso de animais que estão em repouso sexual durante muito tempo, pode melhorar a qualidade do espermática a partir da segunda coleta, por estimular a espermatogênese e remover espermatozoides armazenados por longo período. O número de espermatozoides coletados por essa

¹Discente do curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Ensino Superior e Formação Integral – FAEF, GARÇA-SP – BRASIL. E-mail: fecatardo@gmail.com (14) 99125-2038

²Docente do curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Ensino Superior e Formação Integral – FAEF, GARÇA-SP – BRASIL. E-mail: saarascolari1@yahoo.com.br E-mail: suzana_masrosa@yahoo.com.br

técnica depende da voltagem que for utilizada e da quantidade 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 (MOREIRA, N., 2017).

A aplicação de alta voltagem (8 V) ou quando a probe e eletrodos estão posicionados cranialmente ao local ideal pode causar contaminação por urina (HOWARD, 1993). Os protocolos anestésicos a serem utilizados neste caso podem promover o relaxamento do colo vesical, o que facilita a contaminação por urina. Essa contaminação com a urina pode acarretar perda rápida e irreversível da motilidade dos espermatozoides (GOODROWE et al., 1989), e é facilmente detectado pelo volume, cor, aspecto e pH ácido característico da urina de carnívoros (MOREIRA, N., 2017).

Na coleta por eletroejaculação (EE) o pH do sêmen tende a ser maior que o pH do sêmen coletado por vagina artificial (VA). O aumento da alcalinidade frequentemente é 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).

Para a utilização da vagina artificial na colheita de sêmen de gatos, é necessário um período de treinamento de 2 a 3 semanas, o qual normalmente 60 a 70% dos animais respondem (SOJKA et al., 1970). Geralmente são utilizadas fêmeas em estro, mas pode ser feito o treinamento do macho com uma fêmea castrada ou não, que aceite a monta ou um manequim de pelúcia (MARTINS, M. I. M; JUSTINO, R. C., 2015). 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). Esse método de coleta é aplicado geralmente em colônias de pesquisa quando há necessidade de colheitas seriada (MARTINS, M. I. M; JUSTINO, R. C., 2015).

¹Discente do curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Ensino Superior e Formação Integral – FAEF, GARÇA-SP – BRASIL. E-mail: fecatardo@gmail.com (14) 99125-2038

²Docente do curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Ensino Superior e Formação Integral – FAEF, GARÇA-SP – BRASIL. E-mail: saarascolari1@yahoo.com.br E-mail: suzana_masrosa@yahoo.com.br

Outra técnica que pode ser utilizada para a colheita de espermatozoide dos felinos selvagens é a cateterização uretral, através da introdução de uma sonda uretral fina após a sedação do animal com 130 a 140 µg/kg medetomidina (agonista de receptor α_2) por via intramuscular, que permite a eliminação uretral de espermatozoides sem que haja ejaculação completa. As desvantagens desse método são a necessidade de sedação do macho e o volume obtido de aproximadamente 20 µL (ZAMBELLI et al., 2008).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando que a taxa de ameaça à maioria das populações de felídeos selvagens é crescente, que existem poucos exemplares dessas espécies em cativeiro e que esses tem baixa taxa de fertilidade, é de extrema importância que haja um esforço interdisciplinar e mais colaboração do governo e comunidade científica para resolver esses problemas ecológicos e que haja maior interesse e aplicabilidade nas TRAs, sendo essa uma potente ferramenta para enfrentar os desafios de manejo e auxiliar na conservação dessas espécies juntamente com a criopreservação e a escolha do melhor método de coleta espermática que tem um papel fundamental na variabilidade genética, além de favorecer rápida difusão de material genético e possibilitar a utilização do espermatozoide por período longo ou até indeterminado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

MARTINS, M. I. M.; JUSTINO, R. C., **Criopreservação espermática em felinos: estado da arte**. Rev. Bras. Reprod. Anim., v.39, n.1, p.136-140, jan./mar., BELO HORIZONTE – MG, 2015.

¹Discente do curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Ensino Superior e Formação Integral – FAEF, GARÇA-SP – BRASIL. E-mail: fecatardo@gmail.com (14) 99125-2038

²Docente do curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Ensino Superior e Formação Integral – FAEF, GARÇA-SP – BRASIL. E-mail: saarascolari1@yahoo.com.br E-mail: suzana_masrosa@yahoo.com.br

MOREIRA, N., **Exame andrológico e criopreservação de sêmen em felídeos selvagens.** Rev. Bras. Reprod. Anim., v.41, n.1, p.312-315, jan./mar. BELO HORIZONTE – MG, 2017.

MOREIRA, N., **Técnicas reprodutivas para a conservação de felídeos silvestres.** Rev. Bras. Reprod. Anim., v.41, n.1, p.116-120, jan./mar. BELO HORIZONTE – MG, 2017.

SILVA, S. V.; GUERRA, M. M. P., **Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias.** Rev. Bras. Reprod. Anim., v.35, n.4, p.370-384, out./dez. BELO HORIZONTE – MG, 2011.

¹Discente do curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Ensino Superior e Formação Integral – FAEF, GARÇA-SP – BRASIL. E-mail: fecatardo@gmail.com (14) 99125-2038

²Docente do curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Ensino Superior e Formação Integral – FAEF, GARÇA-SP – BRASIL. E-mail: saarascolari1@yahoo.com.br E-mail: suzana_masrosa@yahoo.com.br