



## Criopreservação espermática em felinos: estado da arte

*Sperm cryopreservation in cats: state of the art*

Maria Isabel Mello Martins<sup>1</sup>, Rebeca Cordeiro Justino

Departamento de Clínicas Veterinárias, REPROA - Laboratório de Reprodução Animal, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Pr, Brasil.

<sup>1</sup>Correspondência: [imartins@uel.br](mailto:imartins@uel.br)

### Resumo

O sêmen congelado pode ser armazenado indefinidamente, e transportado a longas distâncias, para o uso em biotecnologias reprodutivas, aumentando a possibilidade de conservação de espécies ameaçadas de extinção. O método de eleição para colheita de sêmen em felídeos é a eletroejaculação, que pode ser realizada no felino anestesiado com segurança. Pesquisas são necessárias para determinar as melhores curvas de refrigeração, de congelamento/descongelamento pois devido a danos na membrana plasmática e acrossomal, na maioria das vezes ocorre a redução na qualidade do sêmen após a descongelamento, e os melhores resultados obtidos ainda não fornecem altas taxas de gestação.

**Palavras-chave:** congelamento, gatos, refrigeração, sêmen.

### Abstract

*Frozen semen can be stored indefinitely and transported any distance to use in reproductive biotechnologies and has increased potential for conservation of species. To perform semen collection in cats, the first-choice method, is electroejaculation, which can be performed on anesthetized male safely., Research has been carried out to determine the best cooling curves, freeze/thaw curve, but due to damages in the plasma and acrosomal membrane have been decrease in the semen quality after thawing, and the best results obtained do not yet provide higher pregnancy rates.*

**Keywords:** cats, cooling, freezing, semen.

### Introdução

A conservação das espécies está intrinsecamente ligada à manutenção da variabilidade genética. A idealização do Banco Genômico, onde são armazenados materiais biológicos de cunho genético, é uma tentativa de minimizar este caminho destrutivo (Wildt, 1992; Leibo e Songsasen, 2002). O número de exemplares e a disposição geográfica dos animais selvagens em cativeiros são fatores limitantes à pesquisa, e por este motivo, o gato doméstico assumiu um papel importante como modelo experimental para a compreensão da fisiologia reprodutiva e utilização de técnicas reprodutivas em felídeos (Goodrowe et al., 1989; Swanson e Wildt, 1997; Pukazhenthil et al., 2001). Os gatos domésticos (*Felis catus*) primariamente animais de companhia, tornaram-se modelo experimental de aproximadamente 36 espécies de felinos selvagens ameaçadas de extinção, e embora nas últimas décadas muitos estudos tenham sido desenvolvidos, ainda não se dispõe de um modelo ideal para a criopreservação do sêmen. Os felinos domésticos são capazes de produzir espermatozoides viáveis, com motilidade espermática progressiva durante o ano todo, embora estudos tenham demonstrado haver influencia sazonal sobre a espermatogênese (Spindler e Wildt, 1999; Martins et al., 2011). A criopreservação de sêmen em felinos ainda é um grande desafio, devido à queda inaceitável na qualidade do sêmen após a descongelamento, 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; Pukazhenthil et al., 1999, 2001; Leibo e Songsasen, 2002; Penfold et al., 2003), tornando a célula espermática mais frágil ao estresse térmico. O conhecimento da resposta de células espermáticas felinas às várias condições estressantes da criopreservação é necessário para a formulação de protocolos de congelamento mais apropriados. A determinação da força de centrifugação, taxas de refrigeração e de congelamento, concentrações de crioprotetores, tipos de diluentes e técnicas de armazenamento que sejam mais apropriados, também é importante para o sucesso na preservação dessas células.

São dois os métodos de criopreservação de sêmen: a refrigeração e a congelamento. A refrigeração consiste na manutenção do sêmen a 4 ou 5°C, após a diluição em meio extensor (Harris et al., 2001, 2002). É o método indicado para utilização em técnicas reprodutivas, quando o transporte do sêmen pode ser em questão de horas ou até poucos dias. A congelamento espermática em nitrogênio líquido é o segundo método, é a forma de armazenamento de eleição para integrar o Banco de Recursos Genéticos. O sêmen congelado tem um grande potencial para conservação, já que pode ser armazenado por tempo indeterminado e transportado a qualquer distância para utilização em técnicas reprodutivas.



### Colheita de sêmen

A primeira etapa para a criopreservação espermática é colheita de sêmen, em felinos pode ser utilizada a eletroejaculação, a vagina artificial, a cateterização uretral, lavagem da vagina pós-coito e ainda a recuperação espermática da cauda de epidídimo, após a orquiectomia ou a morte do reprodutor. A colheita utilizando o eletroejaculador é o método de eleição para os felinos selvagens e para a maioria dos gatos domésticos, uma vez que o animal deve ser anestesiado e não há necessidade de treinamento prévio. 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 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 são descritos (Martins et al., 2011; Silva et al., 2011; Ackermann et al., 2013). A contaminação por urina pode ocorrer quando altas voltagens (8 V) são aplicadas ou quando a probe e eletrodos estão posicionados cranialmente ao local ideal (Howard, 1993). Os protocolos anestésicos utilizados podem promover o relaxamento do colo vesical, facilitando a contaminação por urina. Essa contaminação causa rápida e irreversível perda de motilidade dos espermatozoides (Goodrowe et al., 1989). 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. É um método de coleta que apresenta grande aplicabilidade em colônias de pesquisa, quando colheitas seriadas são necessárias. A cateterização uretral é uma técnica de colheita dos espermatozoides felinos, que consiste na introdução de uma sonda uretral fina após a sedação do animal com 130 a 140 µg/kg medetomidina (agonista de receptor  $\alpha_2$ ), 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).

### Avaliação espermática

Após a colheita, as avaliações microscópicas devem incluir a análise da motilidade espermática, vigor, concentração e morfologia espermática. O movimento espermático pode ser avaliado por método computadorizado (CASA - Computer Assisted Sperm Analysis), o qual avalia a motilidade total e progressiva, velocidade espermática, amplitude de deslocamento lateral de cabeça, frequência de batimentos, retilinearidade, linearidade do movimento, coeficiente de oscilação e espermatozoides rápidos. Baseados nos parâmetros avaliados são calculados o índice de movimento e o índice de velocidade espermática (Núñez-Martínez et al., 2006). A avaliação da morfologia espermática permite determinar a porcentagem de células com defeitos maiores, menores e totais. Alguns gatos domésticos e muitas espécies de felídeos selvagens possuem altas proporções de espermatozoides anormais, quando essa porcentagem é acima de 60% são classificados como teratospérmicos, e apresentam maior susceptibilidade da membrana plasmática aos danos induzidos pela criopreservação. As anormalidades espermáticas mais frequentes em amostras seminais de gatos domésticos são: macrocefalia, microcefalia, formas duplas, cauda fortemente enrolada ou dobrada, peça intermediária dobrada, gota citoplasmática proximal ou distal e cabeça isolada (Johnston et al., 2001). Poucos estudos têm sido realizados com a avaliação do plasma seminal de felinos e a influência dos microelementos na qualidade espermática; acredita-se que as concentrações de Se e Zn possam prever a qualidade espermática nessa espécie (Villaverde et al., 2014). Avaliações complementares, realizadas principalmente experimentalmente incluem integridade da membrana espermática e acrossomal, fragmentação de DNA, capacitação espermática, peroxidação lipídica, índice de apoptose, teste de ligação/penetração espermática em oócitos e fertilização *in vitro*.

### Criopreservação sêmen

As opções para criopreservação do sêmen, que permitem o transporte das células em baixas temperaturas são: refrigeração (entre 4 a 15°C) ou congelação (-196°C).

A refrigeração do sêmen promove menor dano às células espermáticas, mas o período de armazenamento é curto, aproximadamente 72 h a 5°C, sendo que nas primeiras 24 h ocorre a maioria dos danos espermáticos, como a diminuição da motilidade e do vigor espermático, aumento da proporção de células com alterações morfológicas. O processo de refrigeração pode ser dividido em cinco etapas: colheita, avaliação, centrifugação, diluição e refrigeração. O diluente é o meio que fornece substrato para o metabolismo espermático, promove pressão osmótica adequada e concentração de eletrólitos fisiológica, além de proteger a membrana espermática do choque térmico e reduzir os danos aos espermatozoides durante o processo de criopreservação. As primeiras tentativas para prolongar a viabilidade espermática de felinos, datam da década de 70 (Platz et al., 1978), vários protocolos para a congelação do sêmen têm sido utilizados para os espermatozoides



ejaculados (Wood et al., 1993; Tsutsui et al., 2000; Zambelli et al., 2002) ou epididimários (Luvoni et al., 2003; Tsutsui et al., 2003; Macente et al., 2012). 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). As alterações semelhantes a capacitação, derivadas do choque térmico, também causam alteração do padrão de motilidade e podem culminar numa reação acrossômica “espontânea” inviabilizando a célula espermática para fertilização (Holt, 2000a; Muller, 2000). Na análise ultraestrutural, o choque térmico é manifestado mais claramente por uma ruptura das membranas acrossomais (Tebet, 2004). A membrana espermática de felinos teratospérmicos apresenta maior susceptibilidade aos danos induzidos pela refrigeração, maior sensibilidade ao estresse osmótico, menor estabilidade do DNA, menor capacidade de fertilização após a injeção espermática intra-citoplasmática, maior período para capacitação espermática e reação acrossomal *in vitro* (Pukazhenthil et al., 2001). Os catabólicos produzidos pelo metabolismo espermático acarretam numa drástica redução do pH ocasionado pelo acúmulo de ácidos lácticos no meio extracelular, podendo provocar morte dos espermatozoides (Holt, 2000b). Portanto, a adição de tampões ao meio diluente para a manutenção do balanço iônico e do pH é imprescindível (Holt, 2000b). Substâncias tampão, como o citrato de sódio, TRIS (trishidroximetilaminometano) ou TES (ácido N-trishidroximetil-metil-2-aminometano-sulfônico) têm sido utilizados com sucesso na preservação de gametas felinos (Pope et al., 1991; Tsutsui et al., 2000; Zambelli et al., 2002; Tebet, 2004). Mais recentemente, foi realizado um estudo com a adição de lecitina de soja ao meio Tris, em substituição a gema de ovo, com bons resultados pós-descongelação (Vick et al., 2012). O uso de meios diluidores comerciais, como o Botu-crio® e o Tryladyl para a congelação de espermatozoides felinos demonstraram ser uma opção prática e viável (Macente et al., 2012; Jiménez et al., 2013). 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/descongelação, 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 glicerol é o mais utilizado no meio diluente para a congelação do sêmen de felinos, estudos têm sido desenvolvidos em diferentes concentrações: 4% (Platz et al., 1978; Zambelli et al., 2002; Vick et al., 2012), 5% (Pope et al., 1991; Villaverde et al., 2013) e 7% (Tsutsui et al., 2000; 2003; Tebet, 2004). Acredita-se que os detergentes a base de SDS (dodecil sulfato de sódio), como Equex STM Paste® e Orvus ES Paste® (OEP), dissolvam as lipoproteínas da gema de ovo, aumentando o potencial de penetração das mesmas na membrana plasmática, aumentando a sua ação protetora (Holt, 2000a). A adição de Equex STM Paste® ao meio diluente, utilizado para a criopreservação de espermatozoides epididimários, aumentou a porcentagem de acrossomos intactos após a descongelação, embora tenha reduzido a longevidade dessas células quando incubadas *in vitro* (Axné et al., 2004). A peroxidação dos lipídios, observada nos processos de refrigeração e congelação, pode induzir danos diretos ou mudanças na estrutura e fluidez das membranas espermáticas, causando rápida e irreversível perda da motilidade (Holt, 2000b). Em relação às taxas de refrigeração, existem informações contraditórias na literatura, as taxas mais lentas de refrigeração (0,2 a 0,5°C/ min) foram propostas para minimizar os danos causados às membranas plasmáticas e acrossomais (Pukazhenthil et al., 1999). Entretanto, Zambelli et al. (2002), após testarem cinco taxas para congelação, observaram que a menor taxa utilizada (3,85°C/min) proporcionou os melhores resultados de motilidade e porcentagem de acrossomos normais, enquanto que Tebet et al. (2004), utilizando taxas rápidas de congelação obtiveram resultados semelhantes, motilidade espermática média de 62%. A congelação espermática ultrarrápida pode ser uma alternativa barata e mais rápida do que o processo de congelação tradicional, proporcionando a criopreservação de espermatozoides de epidídimo de gato, para serem utilizados para ICSI ou fertilização *in vitro* (Vizuete et al., 2014).

A descongelação das palhetas de 0,25 mL preconizada é por imersão em banho-maria à 37°C por 30 s (Tsutsui et al., 2000, 2003; Zambelli et al., 2002). Embora Tebet (2004) utilizando 46°C por 15 s obtiveram bons resultados de motilidade pós-descongelação (média de 62%). Ao realizar a congelação ultrarrápida, a descongelação indicada é a imersão de parte da palheta numa solução tampão de DPBS com 1% de BSA a 65°C durante 5 min.

### Considerações finais

A criopreservação espermática de felinos ainda é um desafio à comunidade científica nacional e internacional, pois os resultados atuais são inconsistentes. As dificuldades ocorrem desde a colheita de sêmen de felinos domésticos e selvagens até ao processo efetivo de criopreservação das células espermáticas. Pesquisas têm sido desenvolvidas com a finalidade de determinar as melhores curvas de refrigeração, de congelação/descongelação, entretanto, os melhores resultados obtidos ainda não proporcionam altas taxas de gestação, que não sejam por meio da inseminação intrauterina ou intratubárica. Em muitos estudos a viabilidade espermática pós-descongelação permitem somente a realização de fertilização *in vitro*. Portanto, maiores estudos devem ser conduzidos para que a criopreservação de sêmen de felinos se torne uma biotecnologia



economicamente aplicável.

### Referências

- Ackermann CL, Souza NR, Trevisol E, Volpato E, Lopes MD.** Avaliação da associação de tiletamina, zolazepam, tramadol e isoflurano na coleta de sêmen de gatos domésticos por eletroejaculação. In: XX Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 20, 2013, Uberlândia. Anais... Uberlândia, MG: CBRA, 2013. p.91. Resumo.
- Axnér E, Hermansson U, Linde-Forsberg C.** The effect of Equex STM paste and sperm morphology on post-thaw survival of cat epididymal spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, v.84, p.179-191, 2004.
- Goodrowe KL, Howard J, Schmidt PM, Wildt DE.** Reproductive biology of the domestic cat with special reference to endocrinology, sperm function and in vitro fertilization. *J Reprod Fertil Suppl*, n.39, p.73-90, 1989.
- Harris RF, Gomez MC, Leibo SP, Pope CE.** In vitro development of domestic cat embryos after in vitro fertilization of oocytes with spermatozoa stored for various intervals at 4°C. *Theriogenology*, v.57, p.365, 2002.
- Harris RF, Pope CE, Gomez MC, Leibo SP, Dresser BL.** Storage of domestic cat spermatozoa for extended periods at 4°C. *Theriogenology*, v.55, p.308, 2001. Resumo.
- Holt WV.** Basic aspects of frozen storage semen. *Anim Reprod Sci*, v.62, p.3-22, 2000a.
- Holt WV.** Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, v.53, p.47-58, 2000b.
- Howard JG.** Semen collection and analysis in carnivores. In: Fowler ME (Ed.). *Zoo and wild animal medicine: current therapy*. Philadelphia, PA: W.B. Saunders, 1993. p.390-399.
- Howard JG, Brown JL, Bush M, Wildt ED.** Teratospermic and normospermic domestic cats: ejaculate traits, pituitary-gonadal hormones, and improvement of spermatozoal motility and morphology after swim-up processing. *J Androl*, v.11, p.204-215, 1990.
- Jiménez E, Pérez-Marín CC, Vizuete G, Millan Y, Agüera EI.** Effect of different extenders on in vitro characteristics of feline epididymal sperm during cryopreservation. *Reprod Domest Anim*, v.48, p.665-672, 2013.
- Johnston SD, Kustritz MVR, Oslon PNS.** Semen collection, evaluation and preservation. In: Johnston SD, Kustritz MVR, Oslon PNS. *Canine and feline theriogenology*. Philadelphia, PA: W.B. Saunders, 2001. p.287-306.
- Leibo SP, Songsasen N.** Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species. *Theriogenology*, v.57, p.303-326, 2002.
- Luvoni GC, Kalchschmidt E, Leoni S, Ruggiero C.** Conservation of feline semen: Part I: Cooling and freezing protocols. *Journal of feline medicine and surgery*, v.5, p.203-208, 2003.
- Macente BL, Mansano CFM, Pereira MM, Martins MIM, Gioso MM, Savi PAP, Gutierrez RR.** Congelamento de espermatozoides epididimários de gatos utilizando o diluidor Botu-Crio® após refrigeração por 24h em container de transporte de sêmen Botu-Tainer®. *Acta Vet Bras*, v.6, p.112-117, 2012.
- Martins MIM, Mir F, Vannier F, Fontaine E, Desbois C, Fontbonne A.** Semen characteristics and the seasonal effect in teratospermic domestic cats in north of France. In: Congress of European Veterinary Society on Small Animal Reproduction, 14, 2011, Milan. *Proceedings...* Milan, 2011. p.54. Resumo
- Muller CH.** Rationale, interpretation, validation, and uses of sperm function tests: review. *J Androl*, v.21, p.10-30, 2000.
- Núñez-Martínez I, Moran JM, Peña FJ.** A three-step statistical procedure to identify sperm kinematic subpopulations in canine ejaculates: changes after cryopreservation. *Reprod Domest Anim*, v.41, p.408-415, 2006.
- Penfold LM, Jost L, Evenson DP, Wildt DE.** Normospermic versus teratospermic domestic cat sperm chromatin integrity evaluated by flow cytometry intracytoplasmic sperm injection. *Biol Reprod*, v.69, p.1730-1735, 2003.
- Platz CC, Wildt DE, Seager SWJ.** Pregnancy in domestic cat after artificial insemination with previously frozen spermatozoa. *J Reprod Fertil*, v.52, p.279-282, 1978.
- Pope CE, Zhang YZ, Dresser BL.** A simple staining method for evaluating acrossomal status of cat spermatozoa. *J Zoo Wild Med*, v.22, p.87-95, 1991.
- Pukazhenthí BS, Pelican K, Wildt DE, Howard JG.** Sensitivity of domestic cat (*Felis catus*) sperm from normospermic versus teratospermic donors to cold-induced acrossomal damage. *Biol Reprod*, v.61, p.135-141, 1999.
- Pukazhenthí BS, Wildt DE, Howard JG.** The phenomenon and significance of teratospermia in felids. *J Reprod Fertil Suppl*, n.57, p.423-433, 2001.
- 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*). *Ciênc Anim Bras*, v.12, p.497-405, 2011.
- Sojka NJ, Jennings LL, Hammer CE.** Artificial insemination in the cat (*Felis catus*). *Lab Anim Care*, v.20, p.198-204, 1970.



- Spindler RE, Wildt DE.** Circannual variations in intraovarian oocyte but not epididymal sperm quality in domestic cat. *Biol. Reprod.*, v.61, p.188-194, 1999.
- Swanson WF, Wildt DE.** Strategies and progress in reproductive research involving small cat species. *Int. Zoo Yearbook*, v.35, p.152-159, 1997.
- Tebet JM.** Efeito da criopreservação sobre a célula espermática em três espécies de felinos: a jaguatirica (*Leopardus pardalis*), o tigrina (*L. tigrinus*) e o gato doméstico (*Felis catus*). 2004. 117f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2004.
- Tsutsui T, Tanaka A, Nakagawa K, Fujimoto Y, Murai M, Anzai M, Hori T.** Unilateral intrauterine horn insemination of frozen semen in cats. *J Vet Med Sci*, v.62, p.1247-1251, 2000.
- 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.
- Vick MM, Bateman HL, Lambo CA, Swanson WF.** Improved cryopreservation of domestic cat sperm in a chemically defined medium. *Theriogenology*, v.78, p.2120-2128, 2012.
- Villaverde AISB, 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.
- Villaverde AISB, Fioratti EG, Ramos RS, Neves RC, Ferreira JCP, Cardoso GS, Padilha PM, Lopes MD.** Blood and seminal plasma concentrations of selenium, zinc and testosterone and their relationship to sperm quality and testicular biometry in domestic cats. *Animal Reprod Sci*, v.150, p.50-55, 2014.
- Vizuete G, Jiménez E, Agüera EI, Pérez-Marín CC.** Impact of ultra-rapid freezing on the motility, morphology, viability and acrosome integrity of epididymal cat sperm diluted in sucrose-based extenders. *Reprod Domest Anim*, v.49, p.e5-e8, 2014.
- Watson PF.** The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci*, v.60/61, p.481-492, 2000.
- Wildt DE.** Genetic resource banks for conserving wildlife species: justification, examples and becoming organized on a global basis. *Anim Reprod Sci*, v.28, p.247-257, 1992.
- Wood TC, Swanson WF, Davis RM, Anderson JE, Wildt DE.** Functionality of sperm from normo versus teratospermic cats cryopreserved in pellets or straw containers. *Theriogenology*, v.39, p.342, 1993. Resumo.
- Zambelli D, Caneppele B, Catagnetti C, Belluzzi S.** Cryopreservation of the cat semen in straws: comparison of five different freezing rates. *Reprod Domest Anim*, v.37, p.310-313, 2002.
- 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.
-