

Avanços na andrologia de animais selvagens

Advances in wild animal andrology

Gediendson Ribeiro de Araujo^{1*}, Thyara de Deco-Souza¹

¹ Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS

Resumo

As tecnologias de reprodução assistida (TRA) são de fundamental importância para a conexão de indivíduos em diferentes localidades, facilitando assim o intercâmbio genético e favorecendo a variabilidade genética de uma espécie. Por esta razão, as TRAs podem ser ferramentas importantes para a conservação de espécies ameaçadas de extinção. Apesar dos esforços nas últimas décadas, o avanço no desenvolvimento de tais tecnologias está aquém à urgência de reverter processos de baixa variabilidade genética em algumas espécies. A necessidade de refinamento das técnicas para as particularidades fisiológicas e comportamentais de cada espécie, somada à raridade de acesso aos animais são os principais fatores relacionados às dificuldades em se avançar com as TRAs. As técnicas mais recentes desenvolvidas para a recuperação de espermatozoides em animais selvagens são a colheita farmacológica, com uso de alfa-2-agonistas e a criopreservação / vitrificação testicular com posterior cultivo. Pouco avançou, no entanto, em relação aos métodos de criopreservação, prevalecendo associação clássica de TRIS-gema-glicerol. Discutimos, então os métodos usados para acesso ao gameta masculino em espécies selvagens e suas aplicações na conservação animal.

Palavras-chave: Reprodução Assistida; Andrologia; Animais selvagens; Conservação

Abstract

Assisted reproduction technologies (ART) are of fundamental importance for connecting individuals in different locations, thus facilitating genetic exchange and favoring the genetic variability of a species. For this reason, TRAs can be important tools for the conservation of endangered species. Despite efforts in recent decades, the advance in the development of such technologies is short of the urgency of reversing processes of low genetic variability in some species. The need to refine the techniques for the physiological and behavioral particularities of each species, added to the rarity of access to animals, are the main factors related to the difficulties in advancing with TRAs. The most recent techniques developed for sperm collection in wild animals are pharmacological collection, with the use of alpha-2-agonists and testicular cryopreservation / vitrification with subsequent cultivation. Little progress has been made, however, in relation to cryopreservation methods, prevailing the classic association of TRIS-yolk-glycerol. We therefore discuss the methods used to access the male gamete in wild species and their applications in animal conservation.

Keywords: Assisted reproduction; Andrology; Wild animals; Conservation

Introdução

A biodiversidade se manifesta em três níveis hierárquicos: diversidade genética, diversidade de espécies e diversidade de ecossistemas (Di Castri; Younés, 1996). A saúde (diversidade) genética das populações garante adaptabilidade ao ambiente e qualidade reprodutiva dos indivíduos, sendo assim a base de sustentação da biodiversidade (O'Brien *et al.*, 1985; Wildt *et al.*, 1983). Desta forma, as estratégias de conservação devem garantir a manutenção de populações geneticamente viáveis, reduzindo a perda de indivíduos, e acessando e conectando o recurso genético disponível sob cuidados humanos (*ex situ*) e em seu ambiente natural (*in situ*).

Neste contexto, a reprodução assistida é uma importante ferramenta para a conservação de animais selvagens por facilitar o intercâmbio genético entre indivíduos em diferentes localidades superando as intercorrências advindas da translocação dos animais e otimizando o acesso à genética dos indivíduos. O desafio é então desenvolver e adaptar tais tecnologias às particularidades específicas

*Correspondência: gediendson@gmail.com

Recebido: 16 de maio de 2022

Aceito: 18 de maio de 2022

das espécies selvagens, especialmente as ameaçadas de extinção.

A primeira etapa do desenvolvimento de biotecnologia reprodutiva é compreendida pela colheita e análise de espermatozoides (Barnabe *et al.*, 2002). Diversas técnicas de obtenção de espermatozoides têm sido desenvolvidas, possibilitando a recuperação por meio de métodos tradicionais como eletroejaculação, masturbação e mais recentemente a colheita farmacológica. No entanto, a conservação de gônadas masculinas para posterior cultivo ou xenotransplante possibilitam o acesso a espermatozoides de animais que vieram a óbito mesmo antes de atingir maturidade sexual. Neste artigo discutimos os métodos usados para acesso ao gameta masculino em espécies selvagens e suas aplicações na conservação animal.

Métodos de colheita de espermatozoides

As técnicas clássicas de colheita de sêmen em animais selvagens são a eletroejaculação e a colheita pelo epidídimo: a primeira por poder ser empregada em animal sedado e a segunda por permitir o acesso aos espermatozoides em animais que vieram a óbito ou que foram submetidos a orquiectomia. A colheita por masturbação também é eventualmente empregada, porém exige um grande esforço para treinamento dos animais, logo está restrita a animais mantidos sob cuidados humanos. Para a colheita de sêmen em cachorro do mato, por exemplo, foram necessárias 299 tentativas de colheita para colher 13 amostras de apenas dois dos cinco animais treinados (Carvalho *et al.*, 2020).

A recuperação de espermatozoides epididimário e/ ou do ducto deferente é uma das técnicas mais empregadas em animais selvagens, principalmente em locais onde há abate de animais para controle populacional em reservas. Colheitas eventuais ocorrem oportunamente em animais que vieram a óbito (Bento *et al.*, 2019; Carelli *et al.*, 2017). Apesar de ter o potencial aplicação para animais que foram atropelados ou que vieram a óbito por catástrofes ambientais ou antrópicas, ainda se limita a situações mais controladas em que o acesso ao animal foi imediatamente após seu óbito – podendo o material ser mantido refrigerado por certo tempo (Bento *et al.*, 2019; Iolchiev *et al.*, 2017; Keeley *et al.*, 2012). O desafio atual é avaliar a possibilidade de recuperar os espermatozoides mesmo de animais que já vieram a óbito há algum tempo (Deco-Souza *et al.*, 2021).

A eletroejaculação (EE) é uma técnica empregada em diversas espécies de animais selvagens e por muitos anos foi a principal empregada em animais *in vivo* (Luba *et al.*, 2015; Souza, 2009; Wildt *et al.*, 1991). O protocolo de estímulos elétricos varia de acordo com a espécie, e é necessário adaptar também a probe ao tamanho do animal. Um dos primeiros protocolos foi descrito por Howard *et al.*, (1981) para colheita de sêmen em ungulados, e foi adaptado para outras espécies de animais selvagens (Okano *et al.* 2004; Wildt *et al.*, 1983). Este consiste na aplicação de séries cada uma consistindo em 10 estímulos de mesma intensidade, porém com intensidade crescente entre cada uma das séries. Outro padrão usado consiste na aplicação de estímulos de intensidade crescente (1 V por vez) de até 11 estímulos por série, seguidos de séries com estímulos de mesma intensidade (neste caso no seu valor mais alto) (Kojima *et al.*, 2001; Okano, 2004).

O protocolo anestésico usado tem efeito direto sobre a eficiência da EE. O propofol se mostrou um bom anestésico para colheita de sêmen em catetos, permitindo rápida recuperação anestésica, além da colheita de espermatozoides com melhor qualidade e integridade de membrana (Souza, *et al.*, 2009). Em felinos, a associação de ketamina com um alfa-2-agonista (xilazina, detomidina e medetomidina), é o protocolo mais usado, porém a associação de tiletamina com zolazepan, também é um protocolo eficiente (Santiago-Moreno *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2014). Devido ao estímulo às inervações do trato genito-urinário, as taxas de contaminação por urina ainda são elevadas pela EE, e está relacionada com o posicionamento da probe retal, a intensidade do estímulo aplicado e excesso de urina na bexiga. Visando reduzir a contaminação por urina, a bexiga por ser esvaziada previamente, com auxílio de sonda uretral e soro fisiológico (Deco *et al.*, 2010). Recomenda-se também a troca dos tubos coletores a cada ejaculado evitando a contaminação por amostras posteriores (Da Paz, 2019).

Apesar de ser eficiente, alguns contratempos na aplicação da EE como a possibilidade de contaminação por urina, obtenção de amostras mais diluídas, estimulação ao retorno do plano anestésico (pela estimulação elétrica) e a necessidade de técnicos altamente treinados tem estimulado sua substituição pela colheita de sêmen pelo método farmacológico. Este consiste no uso de drogas que permitem a colheita de sêmen após a ejaculação ou diretamente da uretra por meio de sondagem (Araújo *et al.*, 2018; Silvatti *et al.*, 2020). Os fármacos mais usados em mamíferos selvagens são os alfa-2-Agonistas (α 2-A) como a detomidina, medetomidina e dexmedetomidina (Araújo *et al.*, 2018; Curry; Roth, 2016; Franklin *et al.*, 2018; Kheirkhah *et al.*, 2017; Lueders *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2021; Silva, 2020). A colheita farmacológica permite a obtenção de amostras mais concentradas e com menor risco de

contaminação com urina, por meio de uma técnica simples de ser empregada e com o uso de anestésicos já usados para a contenção de animais selvagens. Estas características têm incentivado a ampliação do seu uso em animais selvagens.

Outra forma mais recente para recuperação de espermatozoides em animais selvagens é a vitrificação ou mesmo congelamento das gônadas. A criopreservação e cultivo de gônadas tem a vantagem de recuperar genética de animais que vieram a óbito mesmo antes de atingirem maturidade sexual (Silva *et al.*, 2020). Estas técnicas aumentam a possibilidade de recuperação da genética de animais, mesmo que estejam longe de um laboratório para processamento, pois aumentam o tempo de armazenamento do material, porém ainda estão em fase de aprimoramento das técnicas de preservação e cultivo.

Avaliação espermática

A avaliação da qualidade espermática é um passo necessário para se prever a capacidade dos espermatozoides de fecundar um oócito (Peña Martínez, 2004). A combinação de critérios mais amplamente usada para avaliar o sêmen incluem: aspecto, volume, pH, motilidade, vigor, concentração e morfologia espermática. Posteriormente foram incluídas avaliações espermáticas mais sofisticadas, como a avaliação da integridade dos espermatozoides utilizando marcadores fluorescentes em microscopia de fluorescência e/ou citometria de fluxo; e análise seminal por sistema computadorizado (CASA - Computer Assisted Sperm Analysis).

O uso de sondas fluorescentes ou fluorocromos isoladas ou em combinações possibilita uma análise mais criteriosa da integridade estrutural dos componentes dos espermatozoides, devido a sua característica de marcar estruturas específicas das células e detectar a integridade estrutural e funcional de forma clara (Peterson *et al.*, 1974).

Pesquisas de integridade da membrana plasmática com animais selvagens têm sido realizadas utilizando diferentes associações de sondas fluorescentes. Tebet (2004) utilizou Iodeto de Propídeo e Diacetato de carboxifluoresceína para verificar a integridade da membrana plasmática de espermatozoides criopreservados de Jaguaritica (*Leopardus pardalis*) e Gato do mato pequeno (*Leopardus tigrinus*). O Iodeto de Propídeo (IP) possui afinidade ao DNA e cora em vermelho o núcleo da célula com membrana plasmática lesionada. O diacetato de carboxifluoresceína (CFDA), por sua vez é hidrolisado por esterases transformando-se em diacetato de carboxifluoresceína na forma livre, sendo retida apenas dentro da célula com membrana intacta, emitindo assim uma fluorescência de coloração verde amarelada (Harrison; Vickers, 1990; Souza, 2001). Baudi (2005) em seu estudo do efeito do resfriamento sobre a função espermática de sêmen criopreservado de felinos (*Leopardus tigrinus*, *Leopardus pardalis* e *Felis catus*) avaliado pelo ensaio competitivo de ligação em ovócito de gata doméstica (*Felis catus*), usou o Iodeto de propídeo e como contra corante o corante supravital Hoechst. Esse corante é comercializado na forma do Hoechst 33258 (H258) ou do Hoechst 33342 (H342), sendo ambos utilizados para verificar a integridade de membrana plasmática, ligando-se especificamente ao DNA e marcando o núcleo da célula em azul (Casey *et al.*, 1993; Maxwell *et al.*, 1996). A diferença entre esses corantes está na permeabilidade da membrana, uma vez que o H258 marca células com membrana lesada e o H342 marca células com membrana íntegra (Casey *et al.*, 1993; De Leeuw *et al.*, 1996). Já Queiroz (2003), em seu estudo do efeito das condições de manipulação do sêmen de jaguatiricas sobre a capacitação e a integridade morfológica e funcional dos espermatozoides, usou o Iodeto de propídeo associado ao FITC-PNA. Este é uma associação de aglutininas de vegetais, nesse caso o amendoim (*Arachys hypogaea*), que possuem afinidade por glicoproteínas encontradas nas membranas acrossomais dos espermatozoides (yanagimachi, 1994). Essa aglutinina associada como o isotiocianato de fluoresceína (FITC), um marcador fluorescente, emite coloração esverdeada no acrossoma lesado. A utilização do FITC-PNA já foi validada por Long et al (1996) que através da microscopia eletrônica de transmissão verificou que o corante apresentava uma ligação bastante específica na membrana externa do acrossomo de espermatozoides de gato doméstico. Outra aglutinina bastante associada ao FITC é a aglutinina da ervilha (*Pisum sativum* – PSA), que se liga aos glicoconjugados da matriz acrossomal e emitem coloração esverdeada no acrossoma lesado (Cross; Meizel, 1989).

A avaliação de amostras seminais por sistemas computadorizados possibilita uma avaliação padronizada dos parâmetros espermáticos entre diferentes estudos e instituições. No entanto, para isso faz-se necessário o desenvolvimento de uma configuração padrão para cada espécie estudada, ou grupo de espécies que possuam morfometria espermática similar. Ainda, é fundamental a descrição do procedimento de preparo das amostras e da câmera de análise para permitir a repetibilidade e a comparação entre os experimentos (Araújo *et al.*, 2021).

A configuração para a CASA em felinos neotropicais foi realizada pela primeira vez padronizado por Jorge-Neto et al. (2020) para onças-pintadas, podendo também ser utilizada para outros felinos, como a onças-pardas. A análise no CASA pode ser realizada com a diluição de uma alíquota do ejaculado em solução tampão (EasiBuffer B; IMV Technologies) ou diluente de sêmen (OptiXcell; IMV Technologies). O fator de diluição a ser utilizado deve almejar a concentração espermática de ~20 x 10⁶ espermatozoides por mL, que resultará em uma quantidade aproximada de 80 células – número considerado ideal – por campo de análise no CASA (Araújo et al., 2021).

Em seguida, 3µL do sêmen diluído devem ser carregados em uma câmera de análise modelo LEJA (4 poços, 20µm, IMV Technologies) e analisada em sistema de análise computadorizado da movimentação espermática. Para definir a configuração em onças-pintadas, Jorge-Neto et al. (2020a) usaram o sistema IVOS II pelo software Animal Breeders II (Hamilton Thorne).

Criopreservação de sêmen

O refinamento dos métodos de criopreservação em animais selvagens é ainda mais desafiador, pois as particularidades fisiológicas imprimem variações espécie específicas que interferem diretamente na resposta ao protocolo empregado. Exemplo emblemático é o caso dos canídeos em que lobos-guará toleram melhor o DMSO como crioprotetor enquanto o lobo vermelho tem melhor resultados com o glicerol (Franklin et al. 2018; Lueders et al., 2013).

Para a maioria das espécies as formulações clássicas com meio TRIS-Citrato com gema de ovo e glicerol são replicadas (Araújo et al., 2021). O efeito crioprotetor da gema é explorado há décadas, porém a variação em sua composição e a maior possibilidade de contaminação bacteriana tem motivado pesquisadores a procurar por alternativas como a lecitina de soja e fosfolípidios (Erdmann, 2014; Erdmann et al., 2020; Vansandt et al., 2019; Vick et al., 2011).

Outra possibilidade é a vitrificação de espermatozoides, uma técnica de congelamento ultrarrápido (2000 a 100000 °C/min), que pode ser mais prático para aplicação a campo (O'Brien et al., 2019). Esta técnica tem demonstrado bons resultados em algumas espécies de animais selvagens (Bóveda et al., 2018; O'Brien et al., 2019; Pradiee et al., 2017, 2015; Pradiee et al., 2018).

Considerações finais

Apesar dos avanços na andrologia de animais selvagens, esse ainda não são suficientes para a efetiva aplicação em programas de reprodução assistida. Muito se evoluiu nas técnicas de recuperação de espermatozoides, porém na maioria das vezes a qualidade seminal (principalmente após o descongelamento) ainda são baixas. Em vista da raridade – e muitas vezes baixa qualidade do material – técnicas como a injeção intracitoplasmática de espermatozoides devem ser consideradas para o aproveitamento de todo o material disponível.

Referências

- Barnabe RC, Guimarães MABV, Oliveira CA, Barnabe WH.** Analysis of some normal parameters of the spermogram of captive capuchin monkeys (*Cebus apella* Linnaeus, 1758). *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.39, n.6, p.331–333, 2002. <https://doi.org/10.1590/S1413-95962002000600010>.
- Bento HJ, Vieira RLA, Iglesias GA, Kuczmarski AH, Dias SMND, Paz RCR.** Coleta e avaliação de espermatozoides epididimários obtidos pela técnica de squeezing em Puma concolor de vida livre. *Natureza Online*, v.17, n.2, p.82–88, 2019.
- Carvalho JC, Silva FE, Rizzoto G, Dadalto CR, Rolim LS, Mamprim MJ, Souza FF, Teixeira CR, Kastelic JP, Ferreira JCP.** Semen collection, sperm characteristics and ultrasonographic features of reproductive tissues in crab-eating fox (*Cerdocyon thous*). *Theriogenology*, v.155, p.60–69, Oct. 2020. DOI 10.1016/j.theriogenology.2020.06.016. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X20303666>.
- Deco TS, Paula TAR, Costa DS, Araujo GR, Garay RM, Vasconcelos GSC, Csermak-Júnior AC, Silva LC, Barros JBG.** Coleta e avaliação de sêmen de pumas (*Puma concolor* Linnaeus, 1771) adultos mantidos em cativeiro. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.34, n.4, p.252–259, 2010.
- Deco-Souza T, Pizzutto CS, Souza LSB, Jorge-Neto PN, Csermak-Jr AC, Araújo GR.** Desafios para a reprodução assistida em animais de vida livre. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.45, n.4, p.253–258, 2021. DOI 10.21451/1809-3000.RBRA2021.033. Available at:

<http://www.cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v45/n4/p.253-258.pdf>.

Di Castri, Younés FT. Introduction: Biodiversity, the Emergence of a New Scientific Field - Its Perspectives and Constraints. In: DI CASTRI, F.; YOUNÉS, T. (eds.). Biodiversity, Science and Development. Towards a New Partnership. Wallingford: Cab International & IUBS, 1996. p.1–11.

Howard JG, Pursel VG, Wildt DE, Bush M. Comparison of various extenders for freeze-preservation of semen from selective captive wild ungulates. *Journal of American Medical Association*, v.179, p.1157–1161, 1981.

Iolchiev BS, Abilov AI, Tadzhiyeva AV, Bagirov VA, Nasibov SN, Shaidullin IN, Klenovitskiy PM, Kombarova NA, Zhilinskiy MA. Biological integrity of bison epididymal sperm under cryoconservation and long storage. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya*, v.52, n.2, p.282–290, 2017. DOI 10.15389/agrobiology.2017.2.282eng. Available at: <http://www.agrobiology.ru/2-2017iolchiev-eng.html>.

Keeley T, Mcgreevy PD, O'brien JK. Cryopreservation of epididymal sperm collected postmortem in the Tasmanian devil (*Sarcophilus harrisi*). *Theriogenology*, v.78, n.2, p.315–325, 15 Jul. 2012. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2012.02.005>.

Kojima E, Tsuruga H, Komatsu T, Murase T, Tsubota T, Kita I. Characterization of semen collected from beagles and captive Japanese black bears. *Theriogenology*, v.55, n.3, p.717–731, Feb. 2001. DOI 10.1016/S0093-691X(01)00439-3. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X01004393>.

Luba CN, Boakari YL, Costa Lopes AM, Silva Gomes M, Miranda FR, Papa, FO, Ferreira JCP. Semen characteristics and refrigeration in free-ranging giant anteaters (*Myrmecophaga tridactyla*). *Theriogenology*, v.84, n.9, p.1572–1580, 2015. DOI 10.1016/j.theriogenology.2015.07.041. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.07.041>.

O'brien SJ, Roelke ME, Marker L, Newman A, Winkler CA, Meltzer D, Colly L, Evermann JF, Bush M, Wildt DE. Genetic basis for species vulnerability in the cheetah. *Science*, v.227, n.4693, p.1428–1434, 22 Mar. 1985. DOI 10.1126/science.2983425. Available at: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.2983425>.

Okano T, Murase T, Tsubota T Electroejaculation and semen cryopreservation of free-ranging Japanese black bears (*Ursus thibetanus japonicus*). *Journal of Veterinary Medical Science*, v.66, n.11, p.1371–1376, 2004. <https://doi.org/10.1292/jvms.66.1371>.

Paz RCR. Novas tecnologias para colheita de sêmen de felídeos domésticos e selvagens. 2019. IV Reunião da Associação Brasileira de Andrologia Animal [...]. Goiania: e-ISBN 978-85-7613-589-0, 2019. p.55–65.

Santiago-Moreno J, Toledano-Díaz A, Sookhthezary A, Gómez-Guillamón F, De La Vega RS, Pulido-Pastor A, López-Sebastián A. Effects of anesthetic protocols on electroejaculation variables of Iberian ibex (*Capra pyrenaica*). *Research in Veterinary Science*, v.90, n.1, p.150–155, Feb. 2011. DOI 10.1016/j.rvsc.2010.05.011. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0034528810001803>.

Silva HVR, Mota Filho AC, Freitas LA, Pinto J, Freire LMP, Silva LDM. Avaliação seminal de onça-parda (*Puma concolor*). 8., Jun. 2014. *Acta Veterinaria Brasilica* [...]. [S. l.: s. n.], Jun. 2014. v.8, p.33–34. <https://doi.org/10.21708/avb.2014.8.0.3963>.

Souza ALP, Castelo TS, Queiroz JPAF, Barros IO, Paula VV, Oliveira MF, Silva AR. Evaluation of anesthetic protocol for the collection of semen from captive collared peccaries (*Tayassu tajacu*) by electroejaculation. *Animal Reproduction Science*, v.116, n.3–4, p.370–375, Dec. 2009. DOI 10.1016/j.anireprosci.2009.02.017. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432009000566>.

Souza TD. avaliação andrológica e criopreservação de sêmen de pumas (*Puma concolor*). P.96, 2009. Available at: http://locus.ufv.br/bitstream/handle/123456789/4980/texto_completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

Wildt DE, Bush M, Howard JG, O'Brien SJ, Meltzer D, Van Dyk A, Ebedes H, Brand DJ. Unique Seminal Quality in the South African Cheetah and a Comparative Evaluation in the Domestic Cat. *Biology of Reproduction*, v.29, n.4, p.1019–1025, 1 Nov. 1983. DOI 10.1095/biolreprod29.4.1019. Available at: <https://academic.oup.com/biolreprod/article/29/4/1019/2766441>.

Wildt DE, Bush M, O'Brien SJ, Murray ND, Taylor A, Graves, JAM. Semen characteristics in free-living koalas (*Phascolarctos cinereus*). *Journal of Reproduction and Fertility*, v.92, n.1, p.99–107, 1 May 1991. DOI 10.1530/jrf.0.0920099. Available at: <https://rep.bioscientifica.com/doi/10.1530/jrf.0.0920099>.