

Coleta e avaliação de espermatozoides epididimários obtidos pela técnica de *squeezing* em *Puma concolor* de vida livre

Squeezing epididymis method for sperm collection and evaluation in free-living *Puma concolor*

Heitor José Bento^{1,2*}, Renan Luiz Albuquerque Vieira³, Gabriella Accardi Iglesias^{1,2}, Antonio Henrique Kuczarski^{1,2}, Sara Maria Dantas da Nóbrega Dias^{1,2} & Regina Celia Rodrigues da Paz^{1,2}

1 Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias (PPGVET), Faculdade de Medicina Veterinária (FAVET), Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Avenida Fernando Corrêa da Costa s/n, Coxipó, Cuiabá, MT 78060-900, Brasil. 2 Laboratório de Pesquisa em Animais de Zoológico (LPAZ), FAVET, UFMT, Avenida Fernando Corrêa da Costa s/n, Coxipó, Cuiabá, MT 78060-900, Brasil. 3 Laboratório de Reprodução Animal, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Avenida Adhemar de Barros, 500, campus Ondina, Salvador, BA, Brasil.

* Autor para correspondência: heitorjbento@gmail.com

Resumo A redução e fragmentação das áreas naturais por ações humanas diminuem o habitat das espécies silvestres, incluindo a suçuarana (*Puma concolor*). A recuperação de células espermáticas viáveis do epidídimo e o desenvolvimento de técnicas de criopreservação possibilitam a formação de bancos genéticos. O presente trabalho tem como objetivo descrever o método de *squeezing* para obtenção e avaliação de espermatozoides epididimários em um espécime de *Puma concolor* de vida livre. Após um espécime de *P. concolor* de vida livre evoluir à óbito devido à atropelamento, os testículos foram coletados juntamente com o escroto, mantidos refrigerados a 4°C e enviados para o LAPAZ-UFMT. A dissecação do complexo testículo-epidídimo foi realizada e, com o auxílio de uma pinça, o epidídimo foi comprimido em direção ao ducto deferente, e o sêmen depositado em uma placa aquecida a 37°C. Avaliação descritiva (motilidade, vigor, integridade da membrana, integridade do acrossoma, concentração espermática e patologia espermática) foi realizada. O volume total

de sêmen obtido foi de aproximadamente 7 µL; os valores de motilidade e vigor foram 0% e 0, respectivamente, a concentração de espermatozóides foi de 837 x 10⁶ células por mL. Concluiu-se que a técnica de *squeezing* mostrou-se eficaz na recuperação de espermatozóides epididimários de *P. concolor* de vida livre após a morte.

Palavras-chave: Conservação, Gatos selvagens, Reprodução animal, Sêmen.

Abstract The natural areas reduction and fragmentation by human actions decrease the wild species habitat, including the Cougar (*Puma concolor*). The epididymis' viable sperm recovery and the cryopreservation techniques development make possible the genetically valuable genebanks formation. The present work aims to describe squeezing epididymis method for sperm collection and evaluation in free-living *Puma concolor*. After *P. concolor* death the testicles were collected together with the scrotum,

kept refrigerated at 4°C and sent to the LAPAZ-UFMT. Dissection of the testis-epididymis complex was performed and, with the aid of a clamp, the epididymis was compressed towards the vas deferens, and the semen was deposited on a plate heated to 37°C. Descriptive evaluation (motility, vigor, membrane integrity, acrosome integrity, sperm concentration and spermatid pathology) was performed. The total volume of semen obtained was approximately 7 µL, the values of motility and vigor were 0% and 0, respectively, sperm concentration was 837 x 10⁶ cells per mL. It was concluded that the *squeezing* technique proved to be effective in free-living *P. concolor* epididymal sperm cells recovery after death.

Keywords: Conservation, Wild cats, Animal reproduction, Semen.

Introdução

A redução e fragmentação de áreas naturais pela ação do homem, como o desmatamento e o avanço das áreas destinadas à agricultura, são responsáveis pela diminuição do *habitat* de diversas espécies silvestres e consequente redução da variabilidade genética (MICHELETTI et al., 2012; ADANIA et al., 2014). Ainda que os felinos selvagens estejam amplamente distribuídos, a ação antrópica sobre o *habitat* destes animais está diminuindo drasticamente o número de indivíduos, ressaltando a necessidade de desenvolver técnicas reprodutivas que contribuam para a conservação destas espécies (ADANIA et al., 2014).

A suçuarana (*Puma concolor*) é a segunda maior espécie de felídeo no Brasil, possuindo hábitos solitários e terrestres, com atividade tanto noturna quanto diurna, sendo este listado pela *International Union for Conservation of Nature* (IUCN) como categoria de pouca preocupação (*Least Concern*) devido à ampla distribuição, porém com sua população apresentando grande decréscimo. A destruição de seu habitat, fragmentação e consequente decréscimo do número de presas naturais, associadas à aproximação desses animais com populações humanas, são as principais ameaças (ADANIA et al., 2014).

Ainda que os trabalhos de avaliação andrológica em suçuaranas sejam realizados com animais mantidos em cativeiro (DECO et al., 2010; ARAU-

JO et al., 2017), a integração das estratégias de conservação *ex situ* e *in situ* aperfeiçoam os programas reprodutivos, permitindo a continuação de processos evolucionários naturais, sendo assim uma importante estratégia para a preservação da diversidade biológica (COSTA; MARTINS, 2008).

A morte de indivíduos ou até mesmo doenças que impossibilitem a cópula ou colheita de sêmen em espécimes viáveis à reprodução pode representar um grande problema. A recuperação de espermatozoides que estejam viáveis no epidídimo e o desenvolvimento de técnicas de criopreservação deste material possibilitam a formação de bancos de germoplasma naqueles indivíduos com considerável valor genético (MONTEIRO et al., 2009).

Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo descrever a coleta e avaliação espermática em um espécime de *P. concolor* de vida livre através de células coletadas do epidídimo utilizando-se a técnica de *squeezing*.

Materiais e Métodos

Este estudo foi conduzido com autorização para atividades com finalidade científica SISBIO/IBAMA/Brasil nº 62089-1.

Um espécime de suçuarana (*P. concolor*), macho, adulto, após atropelamento foi encontrado à beira da rodovia MT 235 (13°48'47.3"S 56°02'22.5"W), município de Nova Mutum, estado de Mato Grosso, Brasil, evoluindo a óbito uma hora após ser encaminhada para uma clínica veterinária do município apresentando fratura na bacia e fêmur direito. Foi realizada coleta dos testículos juntamente com o escroto logo após o óbito, mantendo o mesmo refrigerado a 4°C e enviado ao Laboratório de Pesquisa em Animais de Zoológico (LPAZ-UFMT).

A dissecação dos testículos, coleta do sêmen e início das análises descritas a seguir deu-se quinze horas após a refrigeração do material. O método de coleta dos espermatozoides foi realizado conforme descrito por Iranpour e Valojerdi (2013) com adaptações. Inicialmente, foi realizada a dissecação do complexo testículo-epidídimo, separando posteriormente o epidídimo do plexo pampiniforme e realizada a remoção dos tecidos adjacentes (Figura 1A). Com o auxílio de uma pinça, foi realizada a compressão do epidídimo em sentido ao ducto deferente, sendo

o sêmen obtido depositado em uma placa aquecida a 37°C (Figura 1B).

Foi realizada a avaliação descritiva do sêmen segundo Paz (2013), sendo analisados os parâmetros de motilidade (valores expressos de 0 a 100%), vigor (valores expressos em uma escala de 0 a 5), integridade de membrana (coloração Eosina-nigrosina), integridade acrossômica (coloração Fast Green), concentração espermática e patologia espermática. A concentração espermática foi calculada utilizando-se câmara de Neubauer, após a diluição na proporção de

um volume de sêmen para noventa e nove de formol salino. A morfologia espermática foi avaliada com fixação do ejaculado em formol salino e preparação do material em câmara úmida; para esta avaliação foi contabilizada um mínimo de 200 células em microscópio de contraste de fase (Axio Scope.A1, Zeiss®) em aumento de 1000 vezes, e as anormalidades espermáticas classificadas em defeitos maiores (falhas da espermatogênese) e defeitos menores (falhas durante o período de maturação espermática).

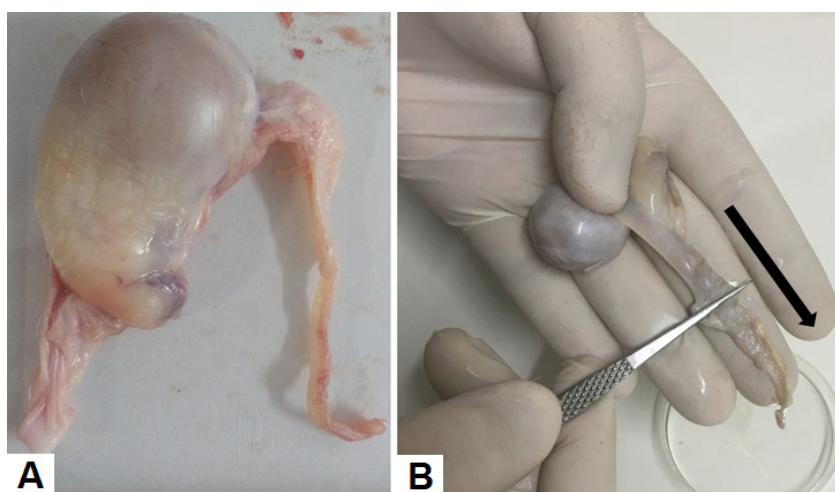


Figura 1. Técnica de *squeezing* realizada para obtenção de células espermáticas epididimais em suçuarana (*Puma concolor*) de vida livre. [A] Testículo após dissecção e separação do complexo testículo-epidídimo, separando o epidídimo do plexo pampiniforme e realizada a remoção dos tecidos adjacentes. [B] Com o auxílio de uma pinça é realizada a compressão do epidídimo em sentido ao ducto deferente (seta)

Resultados

O volume total de sêmen obtido foi de aproximadamente 7µL. Os valores de motilidade e vigor foram de 0% e 0, respectivamente. A concentração espermática foi de 837×10^6 células por mL. Todos os valores obtidos, inclusive os valores de integridade de membrana, integridade acrossômica e patologia espermática encontram-se expressos na Tabela 1.

Dentre as patologias espermáticas mais frequentes, 24,1% apresentavam peça intermediária quebrada sem gota, 14,3% apresentavam cauda quebrada sem gota, 13,7% apresentavam cabeça lanciforme, 10,9% apresentavam-se sem peça intermediária e 9,7% apresentavam gota proximal. Todos os valores obtidos na avaliação das patologias espermáticas encontram-se expressos na Tabela 2.

Discussão

A técnica de *squeezing* utilizada no presente trabalho mostrou-se efetiva, sendo possível recuperar células espermáticas do epidídimo e consequentemente realizar a avaliação descritiva do sêmen de um indivíduo de *P. concolor* de vida livre que evoluiu a óbito.

Em animais que evoluam a óbito ou são submetidos a procedimento de orquiectomia, por exemplo, e que possuam valor zootécnico alto, as técnicas de *squeezing* e *slicing* (fatiamento) tornam-se importantes ferramentas na recuperação de gametas masculinos a fim de compor bancos de germoplasma (DECO et al., 2010). Em espécies de vida livre bem como naquelas ameaçadas de extinção, procedimentos de coleta de espermatozoides epididimários e estudos utilizando-se estas células tornam-se impor-

Tabela 1. Valores de motilidade, vigor, concentração espermática, integridade de membrana, integridade de acrossoma e patologia espermática de um espécime de suçuarana (*Puma concolor*) de vida livre através de células obtidas do epidídimo pela técnica de *squeezing*

Parâmetros avaliados		Valores
Motilidade (%)		0
Vigor (1-5)		0
Concentração (espermatozoides/mL)		837 x 10 ⁶
Integridade de membrana (coloração Eosina-nigrosina)	Viáveis (%)	84
	Não viáveis (%)	16
Integridade de acrossoma (Fast Green)	Viáveis (%)	93
	Não viáveis (%)	7
Patologia espermática	Espermatozoides normais (%)	63
	Espermatozoides anormais [defeitos primários e secundários] (%)	37

Tabela 2. Patologias espermáticas observadas em células obtidas do epidídimo através da técnica de *squeezing* em um espécime de suçuarana (*Puma concolor*) de vida livre

Patologias Espermáticas			
Defeitos primários		Defeitos secundários	
Cabeça lanciforme	13,7%	Peça intermediária quebrada sem gota	24,1%
Sem peça intermediária	10,9%	Cauda quebrada sem gota	14,3%
Microcefálico	6,1%	Gota proximal	9,7%
Macrocefálico	4,2%	Gota distal	3,2%
Peça intermediária anormal	3,2%	Peça intermediária quebrada com gota	2,1%
Cabeça arredondada	2,4%	Pescoço quebrado	1,3%
Cauda fortemente enrolada	2,3%	Cauda quebrada com gota	0,6%
Cabeça piriforme	1,1%		
Acrossoma protuberante	0,4%		
Biflagelado	0,4%		
Bicefálico	0%		
Acrossoma anormal	0%		
Total			
44,7%		55,3%	

tantes quando a obtenção deste material por outros meios (eletroejaculação, por exemplo) tornam-se inviáveis (ABELLA et al., 2014).

O congelamento de espermatozoides epididimários, como os obtidos no presente trabalho, pode ser utilizado em biotecnologias reprodutivas e consequentemente conservação de espécies silvestres através da restauração de populações utilizando-se deste material (COSTA; MARTINS, 2008). A técnica de congelamento de espermatozoides epididimários tem sido empregada em diferentes espécies como ovinos (BERGSTEIN-GALAN et al., 2017a), felinos domésticos (EMERENCIANO et al., 2013) e humanos (OATES et al., 1996), por exemplo.

No presente trabalho foi possível observar que após as quinze horas mantidos à 4°C, espermatozoides epididimários apresentaram motilidade e vigor nulos, diferente de outros estudos com felinos domésticos (EMERENCIANO et al., 2013), ovinos (BERGSTEIN-GALAN et al., 2017a) e ratos (IRANPOUR; VALOJERDI, 2013) que utilizam meios como água de coco, solução Tris e meio Ham's F10 no processo de recuperação dessas células. Sabe-se que estas soluções utilizadas na manipulação de células espermáticas influenciam diretamente na qualidade (EMERENCIANO et al., 2013), e por isso trabalhos que avaliam o uso desses meios em células epididimárias bem como o período de refrigeração dos testículos de *P. concolor* tornam-se necessários a fim de aperfeiçoar o uso desse material para fins reprodutivos e de conservação da espécie. Abella et al. (2014) observou que em ovinos os espermatozoides epididimários mostraram-se férteis por vários dias, mantidos a 4°C e sem uso de qualquer solução.

Ainda que a viabilidade espermática decresça conforme a progressão do tempo *post mortem* (BERGSTEIN-GALAN et al., 2017b), os resultados obtidos com relação à viabilidade espermática no presente trabalho mostraram-se positivos, assim como o observado em outras espécies. Em testículos de ratos mortos, mantidos refrigerados à 4°C, a integridade de membrana (Eosina-nigrosina) no momento zero da coleta foi de 87%, enquanto 24 horas após a coleta esse índice foi de 82,6% (IRANPOUR; VALOJERDI, 2013). Em felinos domésticos, a viabilidade espermática de células do epidídimo utilizando-se diferentes soluções de manipulação foi entre 41,7% (solução a base de Tris) e 58,2% (solução a base de água de coco em pó (ACP-117®) (EMERENCIANO et al., 2013). Em estudos com ovinos, comparando

espermatozoides do ejaculado com espermatozoides da cauda do epidídimo, foi possível observar que não há diferença na viabilidade e fertilidade quando ambos são mantidos a temperatura ambiente (18 – 25°C) por até 24 horas *post mortem* (BERGSTEIN-GALAN et al., 2017a). Ainda que o tempo *post mortem* esteja diretamente correlacionado a viabilidade espermática, Songsasen (1998) demonstra que em camundongos a degeneração testicular inicia aproximadamente seis horas após o óbito, enquanto no epidídimo estas alterações iniciam mais tardiamente, com aproximadamente doze horas após a morte do animal, o que explica a viabilidade destas células várias horas após o óbito em diferentes espécies bem como no indivíduo aqui descrito.

Com relação às patologias espermáticas presentes, observou-se uma frequência maior nos defeitos secundários em relação aos defeitos primários. Isso é esperado visto que os defeitos secundários são aqueles que ocorrem durante o período de transporte e maturação espermática no epidídimo (PAZ, 2013). Desta forma, a coleta de células epididimárias aumenta a chance de que se obtenham células imaturas ou em processo de maturação. Em felinos domésticos, observaram-se alterações secundárias de espermatozoides epididimários consideravelmente maiores em relação às alterações primárias (EMERENCIANO et al., 2013).

Em trabalho realizado por Araujo et al. (2017) em *P. concolor* cativos através de coleta farmacológica utilizando-se demetomidina, a concentração espermática observada foi de $524,1 \times 10^6$ espermatozoides/mL. Deco et al. (2010) através da eletroejaculação em *P. concolor* cativos obteve sêmen com concentração de 205×10^6 espermatozoides/mL. Em felinos domésticos, a concentração média de células epididimárias foi de 175×10^6 espermatozoides/mL (EMERENCIANO et al., 2013), enquanto em garanhões coletados através de fluxo retrógrado a concentração espermática foi de $58,7 \times 10^9$ (GRANEMANN et al., 2005). A concentração espermática observada no presente trabalho mostrou-se superior ao observado em outras técnicas de coleta de sêmen em diferentes espécies, no entanto, vale salientar a importância de se confirmar esse fato em estudos com maior número de espécimes em diferentes populações e condições.

Conclusão

Conclui-se com o presente trabalho que em *Puma concolor* há a possibilidade de se obter gametas masculinos do epidídimo, sendo esta ferramenta importante na formação de bancos genéticos em indivíduos que venham a óbito, como no presente relato. Em espécies silvestres a recuperação de espermatozoides epididimários em indivíduos que evoluam a óbito, ou que estejam impossibilitados de se obter material genético através de outras técnicas de coleta de sêmen, representa o aproveitamento total da capacidade genética disponibilizada por esse indivíduo, acarretando no aumento do sucesso reprodutivo e consequente sucesso na conservação destas espécies de interesse.

Agradecimentos

Os autores agradecem a médica veterinária Dra. Vera Lucia Grodzicki, responsável pelo “Consultório Veterinário Dra. Vera Lucia”, localizado no município de Nova Mutum, estado de Mato Grosso, Brasil, por todo o apoio dispensado para o desenvolvimento deste trabalho.

Referências

ABELLA, D.F.; COSTA, M.; GUÉRIN, Y.; DA-CHEUX, J.L. Fertility of undiluted ram epididymal spermatozoa stored for several days at 4°C. **Animal**, v. 9, n. 2, p. 313 – 319, 2014.

ADANIA, C.H.; SILVA, J.C.R.; FELIPPE, P.A.N. Carnívora – Felidae (Onça, Suçuarana, Jaguaritica e Gato-do-mato). In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS J.L. (Eds). **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. São Paulo: Roca, p. 779 – 818, 2014.

ARAUJO, G.R.; PAULA, T.A.R.; DECO-SOUZA, T.; FERREIRA, L.B.C.; SILVA, L.C.; JORGE NETO, P.N. Pharmacological collection of puma semen (*Puma concolor*). **Anais da 2ª Reunião da Associação Brasileira de Andrologia Animal (ABRAA)**, Corumbá: Embrapa Pantanal, p. 93 – 95, 2017.

BERGSTEIN-GALAN, T.C.; WEISS, R.R.; BERTOL, M.A.; ABREU, A.C.M.R.; BUSATO, E.; KOZICK, L.E.; BICUDO, S.D. Quality and fertility of frozen ovine spermatozoa from epididymides stored at room temperature (18 -25°C) for up to 48 h post mortem. **Theriogenology**, v. 96, n. 2017, p. 69 – 75, 2017(a).

BERGSTEIN-GALAN, T.C.; WEISS, R.R.; KOZICKI, L.E.; BICUDO, S.D. Espermatozoides epididimários: refrigeração e criopreservação. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 41, n. 3, p. 659 – 664, 2017(b).

COSTA, P.M.; MARTINS, C.F. Conservação de recursos genéticos animais através de biotécnicas de reprodução. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 6, n. 1, p. 39 – 55, 2008.

DECO, T.; PAULA, T.A.R.; COSTA, D.S.; ARAÚJO, G.R.; GARAY, R.M.; VASCONCELOS, G.S.C.; BARROS, J.B.G. 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.

EMERENCIANO, K.D.M., LIMA, G.L.; PEIXOTO, G.C.X.; SILVA, M.A.; OLIVEIRA, M.G.C.; PAULA, V.V.; SILVA A.R. Recuperação de espermatozoides epididimários de gatos domésticos (*Felis catus*) utilizando soluções à base de tris ou água de coco em pó. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 7, n. 2, p. 148 – 153, 2013.

GRANEMANN, L.C.; WEISS, R.R.; KOZICKI, L.E.; MURADAS, P.R.; TREML, T.E. Número total de espermatozoides de garanhões obtidos através da colheita com vagina artificial e por fluxo retrógrado da cauda do epidídimo. **Archives of Veterinary Science**, v. 11, n. 1, p. 73 – 77, 2005.

IRANPOUR, F.G.; VALOJERDI, M.R. The epididymal sperm viability, motility and DNA integrity in dead mice maintained at 4-6°C. **Iranian Journal of Reproductive Medicine**, v. 11, n. 3, p. 195 – 200, 2013.

MICHELETTI, T.; CUBAS, Z.S., MORAES, W.; OLIVEIRA, M.J.; & MOREIRA, N. Reprodução natural de felídeos selvagens em cativeiro: dificuldades e orientações. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 36, n. 1, p. 39 – 43, 2012.

MONTEIRO, G.A.; GUASTI, P.N.; PAPA, F.O. Colheita e preservação de células espermáticas de garanhões recuperadas da cauda do epidídimo. **Veterinária e Zootecnia**, v. 16, n. 3, p. 448 – 458, 2009.

OATES, R.D.; LOBEL, S.M.; HARRI, D.H.; PANG,

S.; BURGESS, C.M.; CARSON R.S. Efficacy of intracytoplasmic sperm injection using intentionally cryopreserved epididymal spermatozoa. **Human Reproduction**, v. 11, n. 1, p. 133 – 138, 1996.

PAZ, R.C.R. **Reprodução de Felinos Domésticos e Selvagens**. Cuiabá: EdUFMT, 2013.

The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2018-1. Disponível em <www.iucnredlist.org>. Acesso em 15 jun 2018.

SONGSASEN, N.; TONG, J.; LEIBO, S.P. Birth of Live Mice Derived by In Vitro Fertilization With Spermatozoa Retrieved Up to Twenty-Four Hours After Death. **The Journal of Experimental Zoology**, v. 280, n. 1, p. 189 – 196, 1998.