

CARACTERÍSTICAS DO COMPORTAMENTO HIPERATIVADO DE ESPERMATOZOIDES DE FELINOS DOMÉSTICOS

(Characteristics of the cat sperm hyperactivated behavior)

Ana Beatriz Marques de ALMEIDA; Myrian Megumy Tsunokawa HIDALGO;
Luiz Guilherme Corsi TRAUTWEIN; Aline Martins de SOUZA;
Maria Isabel Mello MARTINS*

Laboratório de Andrologia e Reprodução Animal Assistida, Universidade Estadual de Londrina, Dpto de Clínicas Veterinárias, Rodovia Celso Garcia Cid, 445 - Km 380, Campus Universitário, Londrina/PR. CEP: 86.057-970. *E-mail: imartins@uel.br

ABSTRACT

Sperm hyperactivity is a physiological behavior, and in the feline species it is characterized by an increase in the curvilinear velocity (VCL) and a greater head beat (ALH) evaluated by the CASA system. The study aimed to compare and correlate kinetic parameters of Hyperactive and Non-Hyperactive feline ejaculates when considering the means of VCL and ALH. Ejaculates were collected by electroejaculation from 21 cats. The seminal samples had the kinetic parameters evaluated by the CASA system. From the average values of VCL and ALH, the ejaculates were classified in group HP (Hyperactivated, when $VCL > 190.17 \mu\text{m/s}$ and $ALH > 6.44 \mu\text{m}$) and NHP (Non-Hyperactivated, when $VCL < 190.17$ and $ALH < 6.44 \mu\text{m}$). A T test and Pearson's correlation were performed with a significance of $p < 0.05$. Among the groups, were detected higher values of total (HP: 68,2% vs NHP: 35,9%) and progressive (HP: 40,1% vs NHP: 17,18%) motility, VAP (HP: $165,85 \mu\text{m/s}$ vs NHP: $97,72 \mu\text{m/s}$), VSL (HP: $137,63 \mu\text{m/s}$ vs NHP $82,6 \mu\text{m/s}$), VCL (HP: $237,31 \mu\text{m/s}$ vs NHP: $147,94 \mu\text{m/s}$) and ALH (HP: $7,28 \mu\text{m}$ vs NHP: $5,42 \mu\text{m}$) for the HP group. There was a correlation in the HP ejaculates between total and progressive motility. In the NHP group, a correlation was observed between motility and progressive motility, and between progressive motility and STR and LIN. It was concluded that HP spermatozoa have a higher curvilinear speed, while NHP spermatozoa stand out due to their straight path.

Key words: Cats, CASA system, electroejaculation, sperm hyperactivation, sperm kinetics.

INTRODUÇÃO

A hiperatividade espermática é uma das fases da capacitação e é fundamental para que o espermatozoide esteja apto a penetrar na zona pelúcida, sendo assim favorece a fecundação (SIMONIK et al., 2015; SUAREZ, 2008). O comportamento de hiperativação espermática se caracteriza pelo movimento flagelar assimétrico e aumento da amplitude de cabeça, e deve acontecer quando o espermatozoide se encontra nas tubas uterinas para que se desprendam do muco tubárico, entretanto, quando os espermatozoide se hiperativam precocemente, acarreta em maior gasto energético celular, e reduz a possibilidade de fertilização (SUAREZ, 2008; MARQUEZ e SUAREZ, 2004).

O sistema computadorizado de análise de sêmen (CASA), é uma ferramenta utilizada para identificar a cinética e trajetória de cada uma das células espermáticas por ela analisados (SUAREZ, 2008). Sendo assim, o CASA possibilita caracterizar o comportamento hiperativado dos espermatozoides de forma indireta, por meio da identificação do movimento de amplitude lateral da cabeça (ALH), velocidade curvilínea (VCL) e linearidade (LIN) da trajetória (SUAREZ, 2008).

A padronização de características de hiperativação em células espermáticas já foi descrita em bovinos (MARQUEZ; SUAREZ, 2006), suínos (PAVANELI et al., 2019) e

humanos (MORTIMER; MORTIMER, 1990). Para espermatozoides da espécie felina ainda não existem parâmetros de corte definidos. Contudo, STACHECKI *et al.* (1994) afirmam que o aumento dos parâmetros VCL e ALH, fornecidos pelo sistema CASA, indicam a hiperativação em espermatozoides felinos.

O objetivo deste estudo foi comparar e correlacionar parâmetros cinéticos fornecidos pelo sistema CASA de ejaculados de felinos, a fresco, identificando os grupos Hiperativados e Não hiperativados, ao considerar as médias de VCL e ALH.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais experimentais e colheita de sêmen

O estudo foi conduzido de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) Institucional, sob protocolo nº 8228201796. Foram utilizados 21 felinos domésticos SRD, saudáveis, em idade reprodutiva, provindos de ONG's do município de Londrina. Os animais foram anestesiados com cetamina (10mg/kg) e dexmedetomidina (30µg/kg), para a realização da colheita de sêmen por meio de eletroejaculação seguindo protocolo adaptado de HOWARD *et al.* (1990) por Martins e Justino (2015).

Análise da cinética espermática e formação dos grupos experimentais

As amostras de sêmen foram avaliadas quanto à cinética pelo sistema CASA (Computer Assisted Sperm Analyzer, Hamilton- Thorne IVOS II, Beverly, MA, USA, *setup* para espécie felina), em uma alíquota de 3µL de sêmen em lâmina Cell-vu® coberta com lamínula. Os parâmetros avaliados pelo sistema CASA foram motilidade total (% - MT), motilidade progressiva (% - MP), velocidade média (µm/s - VAP), velocidade progressiva (µm/s - VSL), velocidade curvilínea (µm/s - VCL), amplitude lateral da cabeça (µm - ALH), retilinearidade (% - STR) e linearidade (% - LIN).

Os resultados dos parâmetros VCL e ALH foram submetidos ao teste de Shapiro Wilk e demonstraram ter distribuição normal. Sendo assim, por meio dos resultados fornecidos pelo sistema CASA e dos valores médios de VCL e ALH, os ejaculados foram classificados em dois grupos: HP (Hiperativados) quando $VCL > 190,17 \mu\text{m/s}$ e $ALH > 6,44 \mu\text{m}$ e NHP (Não Hiperativados) com resultados de $VCL < 190,17$ e $ALH < 6,44 \mu\text{m}$.

Análise estatística

Foi realizado teste T para comparar os grupos e correlação de Pearson entre os parâmetros cinéticos de cada um dos grupos, considerando significância quando $p < 0,05$, no software Sigma Plot 12.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos parâmetros cinéticos dos grupos Hiperativado e Não Hiperativado por meio do sistema CASA estão descritos na Tab. 01. A média dos resultados obtidos do grupo

Hiperativado se mostrou superior ao Não Hiperativado ($p < 0,05$) para motilidade total e progressiva, VAP, VSL, VCL e amplitude lateral da cabeça (ALH).

Tabela 01: Características cinéticas dos espermatozoides felinos classificados como hiperativado e não hiperativado obtido por meio da análise do sistema CASA.

Parâmetros	HP (Média±DP)	NHP (Média±DP)	Valor de P
Motilidade (%)	68,2±17,3	35,9±13,8	<0,001
Motilidade Progressiva (%)	40,1±11,3	17,1±8,4	<0,001
VAP (µm/s)	165,8±19,4	97,7±19,3	<0,001
VSL (µm/s)	137,6±18,0	82,6±18,5	<0,001
VCL (µm/s)	237,3±23,5	147,9±23,1	<0,001
ALH (µm)	7,28±0,65	5,4±0,66	<0,001
BFC (%)	34,4±5,5	33,6±5,1	0,746
STR (%)	80,5±3,8	82,1±5,0	0,406
LIN (%)	57,3±6,2	55,8±6,8	0,612

Diferença significativa quando $p > 0,05$.

Os resultados das análises para o grupo Hiperativado demonstraram alta correlação entre motilidade total (MOT) e progressiva (MOTP) ($R^2=86,3\%$, $p=0,0012$), entre MOT P e VAP ($R^2=74,3\%$, $p=0,0139$) e VSL ($R^2=65,4\%$, $p=0,04$). As análises do grupo Não Hiperativado também apresentaram correlações entre MOT e MOTP ($R^2=81,8\%$, $p=0,002$), e entre MOTP e VAP ($R^2=71,3\%$, $p=0,0137$), VSL ($R^2=76,1\%$, $p=0,006$), STR ($R^2=62,8\%$, $p=0,03$) e LIN ($R^2=70\%$, $p=0,015$) destacando a retilinearidade e linearidade de espermatozoides não hiperativados.

Um aumento estatisticamente diferente para os parâmetros VCL e ALH entre os grupos HP e NHP foi identificado. Embora não tenha detectado diferença no parâmetro LIN, este apresentou correlação com MOT no grupo NHP. Estes resultados corroboram com estudos que demonstraram que o sistema CASA detecta as populações de espermatozoides hiperativados em cães e gatos, quando estes apresentam um aumento significativo de VCL e ALH, bem como um decréscimo na linearidade (LIN) (RIJSSELAERE *et al.*, 2012; SCHÄFER-SOMI; AURICH, 2007).

A análise de Rijsselaere *et al.* (2012) apontam que espermatozoides felinos ejaculados tendem a apresentar baixos valores de VSL e LIN. Entretanto, neste estudo, a afirmativa não foi confirmada, pois o VSL obteve maior valor no grupo HP, enquanto LIN não apresentou diferenças.

Os altos valores de MOT, ALH e VCL no grupo HP corroboram com a literatura das características de hiperativação espermática descrita em humanos (MORTIMER e MORTIMER, 1990). O aumento nas velocidades dos espermatozoides está relacionado à sua capacidade de fertilização, portanto, estes parâmetros podem vir a indicar maior probabilidade de fecundação.

CONCLUSÕES

Os espermatozoides felinos de comportamento hiperativado apresentaram maiores valores nos parâmetros cinéticos avaliados, enquanto os não hiperativados se destacaram por sua retilinearidade. Entretanto, ainda são necessários novos estudos, capazes de padronizar a hiperativação de espermatozoides felinos ejaculados.

REFERÊNCIAS

- HOWARD, J.G.; BROWN, J.L.; BUSH, M.; WILDT, D.E. Teratospermic and Normospermic Domestic Cats: Ejaculate Traits, Pituitary—Gonadal Hormones, and Improvement of Spermatozoal Motility and Morphology After Swim-Up Processing. *Journal of Andrology*, v.11, n.3, p.204–215, 1990.
- MARQUEZ, B.; SUAREZ, S.S. Different Signaling Pathways in Bovine Sperm Regulate Capacitation, v.1633, n.2, p.1626–1633, 2004.
- MARQUEZ, B.; SUAREZ, S.S. Bovine Sperm Hyperactivation Is Promoted by Alkaline-Stimulated Ca²⁺ Influx. *Biology of Reproduction*, v.76, n.4, p.660–665, 2006.
- MARTINS, M.I.M.; JUSTINO, R.C. Criopreservação espermática em felinos: estado da arte. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.39, n.1, p.136–140, 2015.
- MORTIMER, S.T.; MORTIMER, D. Kinematics of Human Spermatozoa Incubated Under Capacitating Conditions. *Journal of Andrology*, v.11, n.3, p.195–203, 1990.
- PAVANELI, A.P.P.; PASSARELLI, M.S.; FREITAS, F.V.; RAVAGNANI, G.M.; TORRES, M.A.; MARTINS, S.M.M.K.; YESTE, M.; ANDRADE, A.F.C. Removal of seminal plasma prior to liquid storage of boar spermatozoa: A practice that can improve their fertilizing ability. *Theriogenology*, v.125, p.79–86, 2019.
- RIJSSELAERE, T.; VAN SOOM, A.; MAES, D.; NIZANSKI, W. Computer-Assisted sperm analysis in dogs and cats: An Update after 20 Years. *Reproduction in Domestic Animals*, v.47, Supl.6, p.204–207, 2012.
- SCHÄFER-SOMI, S.; AURICH, C. Use of a new computer-assisted sperm analyzer for the assessment of motility and viability of dog spermatozoa and evaluation of four different semen extenders for predilution. *Animal Reproduction Science*, v.102, n.1/2, p.1–13, 2007.
- SIMONIK, O.; SICHTAR, J.; KREJCARKOVA, A.; RAJMON, R.; STADNIK, L.; BERAN, J.; DOLEZALOVA, M.; BINIOVA, Z. Computer assisted sperm analysis - The relationship to bull field fertility, possible errors and their impact on outputs: A review. *Indian Journal of Animal Sciences*, v.85, n.1, p.3–11, 2015.
- STACHECKI, J.J.; GINSBURG, K.A.; ARMANT, D.R. Stimulation the Domestic Pentoxifylline, of Cryopreserved Epididymal Spermatozoa Cat Using the Motility Stimulants

Ciência Animal, v.30, n.4, p.214-218, 2020. Supl. 2 (X CONERA)

Caffeine, and 2'-Deoxyadenosine. Journal of Andrology, v.15, n.2, p.157–164, 1994.

SUAREZ, S.S. Control of hyperactivation in sperm. Human Reproduction Update, v.14, n.6, p.647–657, 2008.