

VIABILIDADE ESPERMÁTICA EM SÊMEN *IN NATURA* E REFRIGERADO DE VEADO-CATINGUEIRO

(*Sperm viability of brown brocket deer fresh and cooled semen*)

Vitor Lima TORRES^{1*}; Kissya Ellen ALVES¹; Duanny Murinelly de Souza CUNHA¹; Bruna Farias BRITO¹; Mirley Barbosa de SOUZA¹; Dárcio Ítalo Alves TEIXEIRA¹

¹Universidade Estadual do Ceará (UECE), Av. Dr. Silas Munguba, 1700, Campus Itaperi, Fortaleza-Ce, CEP: 60.740-000. *Email: vitorortres.mv@outlook.com

ABSTRACT

The brown brocket deer is in risk of extinction in two brazilian states. Therefore, more studies on semen evaluation may be useful to improve male reproductive capacity assessment. In this sense, this study evaluated the sperm viability using eosin-nigrosin and compared the results of fresh and cooled semen samples. Although the viability decreased in cooled semen, it maintained a satisfactory result.

Key words: reproduction; sperm viability; Cervidae.

INTRODUÇÃO

O veado-catingueiro (*M. gouazoubira*) é um cervídeo, que apesar de ser uma espécie classificada mundialmente como pouco preocupante pela IUCN (2008), no Rio Grande do Sul é considerado vulnerável e no Rio de Janeiro é considerado em perigo (BERGALLO *et al.*, 2000; FONTANA *et al.*, 2003; MIKICH e BÉRNILS, 2004). Logo, métodos de preservação da espécie se fazem necessárias, sendo que o uso de biotécnicas que ajudam a selecionar os melhores reprodutores e otimizar os índices reprodutivos surgem como uma das ferramentas que podem ser utilizadas com sucesso para a espécie.

A avaliação das células espermáticas através de colorações, com a finalidade de atestar sua viabilidade, é um método rápido que já foi utilizado em bovinos (TEIXEIRA, 2009), aves (KLIMIWICZ-BODYS *et al.*, 2012) e peixes (STREIT-JR *et al.*, 2004), mostrando-se eficaz. Devido à importância de se conhecer o parâmetro de viabilidade para o status reprodutivos, este estudo teve como objetivo utilizar a técnica de coloração por eosina-nigrosina para avaliar a viabilidade de sêmen *in natura* e refrigerado de veados-catingueiros, de criatórios de instituições privadas do Ceará.

MATERIAL E MÉTODOS

Todas as coletas de material seminal foram autorizadas pelo ICMBio (nº de solicitação 60925) e pelo Comitê de Ética da UECE (nº de protocolo 7913746-2017). Foi realizada a coleta de sêmen de 3 animais (n=5), com um eletroejaculador (Neovet Autoejac v2, Neovet, Brasil), acoplado a uma sonda (probe). Após sedação com dardo anestésico (via intramuscular), contendo associação de 5 a 10 mg/kg de cloridrato de quetamina (Cetamin, Syntec, Brasil) e 0,5 a 1,5 mg/kg de cloridrato de xilazina (Xilazina 10%, Venco, Brasil), o animal recebeu 3 séries de eletrochoques com 10 estímulos em cada voltagem (de 4, 5 e 6 V; 5, 6 e 7 V; 6, 7 e 8 V). Entre cada série foi realizado um intervalo de 5 minutos (MONFORT *et al.*, 1993). O sêmen foi coletado em um tubo Falcon estéril de 50 mL e mantido em banho-maria a 37°C, até a finalização dos procedimentos.

*Endereço para correspondência:
vitorortres.mv@outlook.com

Após o procedimento, alíquotas foram direcionadas para análise do sêmen *in natura*, uma parte foi diluída em duas de diluente (4,54g de Tris, 2,6g de ácido cítrico, 0,75g de glicose, 10% de gema de ovo, 500 µl de sulfato de amicacina em 100 mL de água bidestilada) em um microtubo e levados a um isopor para refrigeração, em uma curva de -0,25 °C/min da temperatura de 37 °C a 5 °C (adaptado de FAVORETTO *et al.*, 2012). As amostras permaneceram a 5° C durante 15 minutos e foram reaquecidas a 37° C para avaliação.

Para análise da viabilidade espermática, foram confeccionados esfregaços em lâmina pré-aquecida a 37 °C, utilizando 5 µl do corante eosina-nigrosina (BARIL *et al.*, 1993) adicionado a 5 µl do sêmen. Foram contadas 200 células, sendo considerados como espermatozoides viáveis (%), os que possuíam integridade de membrana e não se coravam.

Os dados obtidos foram expressos em média e desvio padrão e analisados através do software estatístico *R-project*® versão 3.3.2 (*The R Foundation*, Viena, Áustria). Os dados foram analisados em delineamento inteiramente casualizados, sendo submetidos ao teste de homocedasticidade *Box-Cox* e ao teste de normalidade *Cramer-von Mises*. Posteriormente, foram submetidos à ANOVA, seguidos pelo Teste de *Student-Newman-Keuls*, para comparação das médias entre os grupos (fresco e refrigerado). Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se que nas amostras avaliadas de sêmen fresco a porcentagem de espermatozoides viáveis foi significativamente superior àquela das amostras refrigeradas (Tab. 1). Além de eosina-nigrosina, outras técnicas, como a TST (*triple-stain technique*) e a técnica de fluorescência também podem ser usadas para avaliar a viabilidade espermática em cervídeos (FAVORETTO; ZANETTI; DUARTE, 2012) (GARDE *et al.*, 1997), porém o uso de eosina-nigrosina é pouco dispendioso e pode ser usado para avaliar tanto viabilidade quanto morfologia espermática (KLIMIWICZ-BODYS *et al.*, 2012).

Tabela1: Média $\pm$ desvio padrão das viabilidades espermáticas do sêmen *in natura* e refrigerado de veados-catingueiros (*M. gouazoubira*).

	<i>In natura</i>	Refrigerado
Membrana Íntegra (%)	86,5 $\pm$ 4,40 ^A	74,5 $\pm$ 5,12 ^B

A, B Letras maiúsculas sobrescritas diferentes na mesma linha significa que houve diferença estatística entre os tempos de avaliação ($p < 0,05$).

Como esperado da amostra refrigerada, a média foi menor, provavelmente, devido ao choque térmico decorrente da curva de refrigeração, demonstrado por Hammerstedt *et al.* (1990) e Amamm e Pickett (1987), que pode causar lesões na membrana plasmática dos espermatozoides.

Em amostras descongeladas de veados-catingueiros, os dados obtidos foram 67% a 78% de células viáveis, utilizando o corante eosina-nigrosina. As amostras *in natura*, entretanto, não foram avaliadas (PERONI, 2013). Em outros trabalhos realizados em cervídeos, de Favoretto *et al.* (2012), em *M. americana*, e de Fernández-Santos *et al.* (2006), em *Cervus elaphus hispanicus*, foram obtidas médias superiores a 50% em amostras descongeladas. Na espécie *Ozotocerus bezoarticus*, amostras seminais *in natura* obtiveram uma viabilidade média de 80,2%, utilizando eosina-nigrosina (BERACOCHEA *et al.*, 2014).

CONCLUSÃO

Conclui-se que apesar do decréscimo na viabilidade após a refrigeração, os parâmetros foram considerados satisfatórios. Vale destacar a necessidade de padronização para a validação do teste para a espécie.

BIBLIOGRAFIA

- AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principle of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary*, v.7, p.145–173, 1987.
- BARIL, G.; CHEMINEAU, P.; COGNIÉ, Y.; GUÉRIN, Y.; LEBOEUF, B.; VALLET, J.C. Manuel de formation pour l'insémination artificielle chez les ovins et les caprins (Training Manual on Artificial Insemination in Sheep and Goats), 1st Edition. FAO, Rome, 1993. 219p.
- BERACOCHEA, F. et al. Sperm characterization and identification of sperm sub-populations in ejaculates from pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*). *Animal reproduction science*, v. 149, n. 3-4, p. 224-230, 2014.
- BERGALLO, H.G.; ROCHA, C.F.D.; ALVES, M.A.S.; VAN SLUYS, M. A fauna ameaçada de extinção do estado do Rio de Janeiro. 1^a ed. Rio de Janeiro: EDUERJ, 2000. 166p.
- FAVORETTO, S.M.; ZANETTI, E.S.; DUARTE, J.M.B. Cryopreservation of red brocket deer semen (*mazama americana*): comparison between three extenders. *Journal of Zoology and Wildlife Medicine*, v.43, n.4, p.820-827, 2012.
- FERNÁNDEZ-SANTOS, M.R.; ESTESO, M.C.; SOLER, A.J.; MONTORO, V.; GARDE, J.J. Effects of egg yolk and cooling rate on the survival of refrigerated red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, v.41, p.114-118, 2016.
- FONTANA, C.S.; BENCKE, G.A.; REIS, R.E. Livro vermelho da fauna ameaçada de extinção no Rio Grande do Sul. EDIPUCRS, M. 2013. 632p.
- GARDE, J.J.; ORTIZ, N.; GARCÍA, A.; GALLEGU, A. Use of a triple-stain technique to detect viability and acrosome reaction in deer spermatozoa. *Archives of Andrology*, v.39, n.1, p.1-9, 1997.
- HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K.; NOLAN, J.P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *Journal of Andrology*, v.11, p.73-88, 1990.
- IUCN IUCN Red list of threatened species. Version 2017-1. 2008. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org/details/29620/0> >. Acesso em 18 mai de 2017.
- KLIMOWICZ-BODYS, M.D.; BATKOWSKI, F.; OCHREM, A.S.; SAVIC, M.A. Comparison of assessment of pigeon sperm viability by contrast-phase microscope (eosin-

nigrosin staining) and flow cytometry (SYBR-14/propidium iodide (PI) staining) [evaluation of pigeon sperm viability]. *Theriogenology*, v.77, n.3, p.628-635, 2012.

LUZ, S.L.N. da; NEVES, J.P.; GONÇALVES, P. B. D. Parâmetros utilizados na avaliação do sêmen congelado ovino para inseminação laparoscópica. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 37, n. 2, p. 141-145, 2000.

MIKICH, S.B.; BERNILS, R.S. Livro Vermelho da fauna ameaçada no Estado do Paraná. Instituto Ambiental do Paraná, 2004. 763p.

MONFORT, S.L.; ASHER, G.W.; WILDT, D.E.; WOOD, T.C.; SCHIEWE, M.C.; WILLIAMSON, L.R.; BUSH, M.; RALL, W.F. Successful intrauterine insemination of Eld's deer (*Cervus eldi thamin*) with frozen-thawed spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.99, p.459-465, 1993.

PERONI, E.F.C. Inseminação artificial intrauterina por videolaparoscopia em veado catatingueiro (*Mazama gouazoubira*) com sêmen congelado. 2013. 76p. Dissertação (Mestrado acadêmico em Medicina Veterinária – Reprodução Animal). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal, 2013.

STREIT-JR, D.P.; MORAES, G.V.; RIBEIRO, R.P.; POVH, J.A.; SOUZA, E.D.; OLIVEIRA, C.A.L. Avaliação de diferentes técnicas para coloração de sêmen de peixes. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoológicas*, v.7, n.2, p.157-162, 2004.

TEIXEIRA, L.V. Estudo da Coleta e Processamento de Sêmen Bovino. 2009. 37p. Monografia (TCC de Medicina Veterinária) - Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas - FMU, São Paulo – SP, Brasil.

WHO (World Health Organization). WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5. ed. Suíça: WHO Press., 2010. 271p. Disponível em: <http://www.who.int/reproductivehealth/publications/infertility/9789241547789/en/>. Acesso em: 27 Jun 2018.