

Análise seminal e padronização da coloração eosina-nigrosina em tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*)*

Giant anteater's (*Myrmecophaga tridactyla*) semen analysis and eosin-nigrosin staining standardization

Pedro Paulo Tsuneda,** Moacir Ferreira Duarte Junior,** Luis Eduardo Senra e Silva,** Adriano Alves Jorge,**
Luciana Keiko Hatamoto-Zervoudakis,** Regina Celia Rodrigues da Paz****

Resumo

Os estudos que envolvem os aspectos reprodutivos do tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) podem contribuir para a preservação da espécie auxiliando no desenvolvimento de um manejo reprodutivo mais eficiente em cativeiro. O presente estudo teve como objetivo obter uma melhor compreensão da fisiologia reprodutiva por meio da caracterização física e morfológica do sêmen de tamanduá-bandeira. Foram realizados três exames reprodutivos em dois tamanduás-bandeira mantidos no Zoológico da Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá/MT/Brasil. O método de coleta do sêmen foi a eletroejaculação. O volume médio obtido foi de $2,62 \pm 1,67$ mL, com motilidade média de $50 \pm 20\%$ e vigor de $2,17 \pm 0,82$. O pH médio foi de $7,29 \pm 0,40$. Quanto à patologia espermática foram encontrados 16,5% de defeitos maiores, 20,5 % de defeitos menores, perfazendo $37 \pm 4,2\%$ de defeitos totais. Os testes preliminares de padronização da coloração eosina-nigrosina mostraram-se eficazes para avaliar a integridade da membrana plasmática de espermatozoides nesta espécie, que nesta pesquisa foi de $65 \pm 7,77\%$.

Palavras-chave: eletroejaculação, *Pilosa*, reprodução, *Xenarthra*.

Abstract

Studies involving the reproductive aspects of the giant anteater (*Myrmecophaga tridactyla*) can be contributed to the preservation of this specie. The aim of these study was accessed the reproductive physiology and describe physical and morphological giant anteater's sperm. We conducted three reproductive examination in two anteater maintained at the Federal University of Mato Grosso Zoo, Cuiaba/MT/Brazil. The method of semen collection used was electroejaculation. The volume average obtained was 2.62 ± 1.67 mL, the motility average was $50 \pm 20\%$ and the vigor was 2.17 ± 0.82 . The pH mean was 7.29 ± 0.40 . The sperm average concentration was $33.33 \pm 12.52 \times 10^6$ sperm/mL. According sperm pathology we found 16.5% of larger defects, 20.5% of minor defects, amounting to $37 \pm 4.2\%$ of total defects. The preliminary tests of standardization of eosin-nigrosin staining proved to be effective to evaluate the integrity of plasma membrane of sperm in this species, in this research was $65 \pm 7,77\%$.

Keywords: electroejaculation, *Pilosa*, reproduction, *Xenarthra*.

Introdução

O tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*), maior espécie de tamanduá do mundo, encontra-se distribuído por toda América Central e do Sul, vivendo em habitats variados, incluindo florestas e pastagens abertas (Miranda et al., 2003). Pertence à Ordem *Xenarthra* (Xenon = estranho e Arthros = articulação), atualmente desmembrada em duas ordens: *Cingulata* representada pelos tatus e *Pilosa* representada pelos tamanduás e preguiças (MEDRI et al., 2006). Não possuem dimorfismo sexual evidente, embora as fêmeas sejam menos corpulentas e apresentem peso menor comparada aos machos (Miranda, 2004).

Os aspectos reprodutivos dos tamanduás ainda não foram profundamente estudados. Os machos apresentam seus testículos no interior da cavidade pélvica, não expõem o pênis

e ambos os sexos apresentam uma fenda genital, dificultando a sexagem (Medri et al., 2006; Miranda e Costa, 2007).

A análise descritiva do sêmen compreende a avaliação do volume do ejaculado, pH, porcentagem de motilidade espermática, vigor, concentração, morfologia, integridade acrossomal e percentual de células vivas (Howard, 1993).

A viabilidade espermática está intimamente relacionada com a integridade da membrana plasmática, cuja avaliação pode ser realizada por meio de colorações vitais. Os corantes mais utilizados são eosina-nigrosina, azul de tripan e azul de bromofenol. A análise da integridade da membrana plasmática utilizando a coloração eosina-nigrosina classifica os espermatozoides como viáveis (não corados) e inviáveis (corados) (Derivaux, 1980; Mies Filho, 1987; Oliveira et al., 2009). O teste baseia-se na permeabilidade celular e, portanto,

*Recebido em 19 de março de 2015 e aceito em 20 de setembro de 2015.

**Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal, Faculdade de Agronomia, Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), 78060-900, Cuiabá, MT, Brazil.

***Departamento de Ensino, Instituto Federal de Mato Grosso (IFMT), 78652-000, Confresa, MT, Brazil.

****Laboratório de Pesquisa em Animais de Zoológico, Faculdade de Agronomia, Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), 78060-900, Cuiabá, MT, Brazil. Autor para correspondência: reginacrpaz@gmail.com.

espermatozoides viáveis (vivos) permanecem incolores enquanto os não viáveis (mortos) permitem a penetração do corante corando a célula em rosa (Nasr-Esfahani et al., 2002).

O presente estudo teve como objetivo realizar a análise descritiva do sêmen de tamanduás-bandeiras avaliando sua motilidade, vigor, pH, volume, concentração e morfologia espermática. Para a avaliação da integridade da membrana plasmática, testes preliminares de padronização da coloração eosina-nigrosina foram realizados.

Material e métodos

O estudo foi realizado em dois tamanduás-bandeiras adultos do acervo do Zoológico da Universidade Federal de Mato Grosso em Cuiabá/MT/Brasil, mantidos com fêmeas da mesma espécie em recintos abertos à visitação. Foram realizadas três coletas em cada animal, com intervalos de 30 dias, perfazendo um total de seis coletas. Os animais foram identificados como T2 e T4. Para realização do procedimento foi utilizada contenção física com puçá e em seguida química, administrando-se a associação tiletamina-zolazepan (Zoletil®, Virbac, Brasil) na dose 3-4 mg/kg (Deem e Fiorello, 2002). Para manutenção anestésica foi utilizada anestesia inalatória com isoflurano.

Para coleta de sêmen a região prepucial foi lavada com água e sabão, secando-se com papel-toalha descartável e o excesso de pelos foi cortado. O sêmen foi coletado por eletroestimulação, utilizando-se eletroejaculador (Autojac®, Neovet, Brazil). O protocolo de eletroejaculação utilizado foi o proposto por Howard et al. (1986) consistindo em um total de 80 estímulos elétricos de 2 a 5 V, aplicados em três séries (com 30, 30 e 20 estímulos) com intervalo de 10 min entre cada série.

Imediatamente antes da introdução do eletrodo no reto do animal foi colocado um tubo plástico transparente de 15 mL, pré-aquecido, na extremidade do prepúcio, uma vez que esses animais não expõem o pênis. Os frascos coletados foram armazenados em banho-maria a 35°C até a avaliação e processamento. Após o término de cada série, foi realizada a avaliação do volume parcial do ejaculado em tubo graduado e avaliação do sêmen quanto ao aspecto (avaliação visual de coloração e viscosidade), motilidade (0-100%) e vigor (variando de 0 – sem motilidade a 5 – movimentos progressivos constantes com velocidade rápida) em microscópio de luz (CBRA, 2013). Ao final da coleta, as alíquotas obtidas com presença de espermatozoides móveis foram combinadas e analisadas quanto ao pH utilizando fita reagente e avaliadas quanto ao volume final utilizando-se tubo graduado. Uma alíquota de cada amostra foi diluída em solução de formol-salino (1:100) para avaliação da concentração em câmara de contagem de Neubauer. Utilizou-se esta mesma amostra para realizar a análise da morfologia espermática em câmara úmida analisando-

se 200 células em microscópio de contraste de fase, seguindo os critérios estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (2013).

Outras duas alíquotas de sêmen, com 50 µL cada, foram separadas para padronização do teste de integridade da membrana plasmática utilizando-se a coloração eosina-nigrosina. A primeira alíquota (grupo controle) foi separada e permaneceu em banho-maria a 35°C, a segunda alíquota foi submetida ao congelamento em nitrogênio líquido, e logo após descongelado em banho-maria a 35°C até o seu descongelamento total, sendo este procedimento repetido por três vezes para que a membrana plasmática dos espermatozoides fosse danificada (grupo danificado). O sêmen controle foi misturado ao sêmen danificado nas respectivas proporções em porcentagem: 100/0 (10 µL controle/0 µL danificado), 80/20 (20 µL controle/5 µL danificado), 50/50 (10 µL controle/10 µL danificado), 20/80 (5 µL controle/20 µL danificado), 0/100 (0 µL controle/10 µL danificado). Para cada proporção foram depositados 5 µL do sêmen diluído e 5 µL de corante eosina-nigrosina em uma lâmina, os quais permaneceram por um minuto antes da realização do esfregaço. Após este procedimento as lâminas foram secas à temperatura ambiente e 200 espermatozoides por lâmina foram contados em microscópio de luz, em aumento de 400x.

Todos os procedimentos realizados neste experimento foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais - (CEUA/UFMT: 23108.015046/10-5) e pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade / Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade / Ministério do Meio Ambiente – (SISBIO/ICMbio/MMA: 31467-1).

Resultados

A avaliação física do sêmen apresentou volume médio de 2,62 ± 1,67 mL, motilidade média de 50 ± 20% e vigor de 2,17 ± 0,82. O pH médio foi de 7,29 ± 0,40. A concentração espermática média foi de 33,33 ± 12,52, x 10⁶ espermatozoides/mL (Tab. 1).

Tabela 1: Avaliação física do sêmen de tamanduás-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*)

	1° Coleta		2° Coleta		3° Coleta		Médias/DP*
	T2	T4	T2	T4	T2	T4	
Volume (mL)	2,6	1,3	1	1,5	4,8	4,5	2,62 ± 1,67
Motilidade (%)	60	70	60	60	30	20	50 ± 20
Vigor (1-5)	2	2,5	1	3	3	1,5	2,17 ± 0,82
pH	8	7,5	7	7	7,25	7	7,29 ± 0,40
Conc. Espermática (x 10 ⁶ /ml)	30	45	30	50	15	30	33,33 ± 12,52
Espermatozóides Totais (x 10 ⁶)	78	58,5	30	75	72	135	74,75 ± 34,39

*DP – Desvio padrão

A porcentagem média de espermatozoides morfologicamente normais foi de 63 ± 4,55%, sendo observados 16,5 % de feitos maiores e 20,5 % de defeitos menores, perfazendo um total de 37 ± 4,2 % de feitos totais. (Tab.2).

Tabela 2: Avaliação morfológica espermática de tamanduás-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*)

Coleta	1°		2°		3°		Médias/DP*
Defeitos maiores (%)	T2	T4	T2	T4	T2	T4	
Macrocéfalo	0	0	0	1	1	1	0,5±0,55
Microcéfalo	0	2	0	0	2	4	1,33±1,63
Cabeça piriforme	0	2	0	2	0	0	0,67±1,03
Cabeça lanciforme	12	9	12	10	2	6	8,5±3,89
Acrossomo anormal	0	0	0	0	0	2	0,33±0,82
Cauda fortemente enrolada	8	4	8	0	5	2	4,5±3,21
Biflagelado	2	0	0	0	1	1	0,67±0,82
Defeitos menores (%)							
Peça intermediária quebrada sem gota	20	20	12	12	16	12	15,33±3,93
Peça intermediária quebrada com gota	2	4	0	1	0	0	1,17±1,6
Cauda quebrada sem gota	0	4	0	0	4	4	2±2,19
Gota proximal	2	0	0	3	0	0	0,83±1,32
Pescoço quebrado	1	0	3	0	1	2	1,17±1,17
Total de defeitos (%)							37±4,2
Espermatozoides normais							63±4,55

*DP – Desvio padrão

A porcentagem de células vivas proporcional a cada diluição utilizada para padronização do teste de eosina-nigrosina está apresentada na Tab. 3.

Tabela 3: Porcentagem de células vivas em cada proporção da diluição para padronização da coloração eosina-nigrosina para sêmen de tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*)

Diluição: vivo/morto (%)	Células vivas (%)	
	T2	T4
100/0	70,5	59,5
80/20	57	49,5
50/50	44	23
20/80	11	9
0/100	0	0

Discussão

A coleta de sêmen por eletroejaculação foi efetiva, sendo que nenhuma das amostras apresentou contaminação por urina. As coletas foram realizadas com intervalos de 30 dias, sendo que o tempo de coleta foi de aproximadamente 45 minutos. Em relação ao aspecto do ejaculado, observou-se uma variação de translúcida a leitosa, sendo esta última a mais concentrada. Em todas as amostras de sêmen foi observada presença de

gotículas de gordura, porém essas gotículas não atrapalharam a avaliação do sêmen como descrito por Mendonça (2010), que utilizou a centrifugação para separar os espermatozoides desta substância.

O volume médio do ejaculado encontrado neste experimento foi de 2,62 mL contrastando com Mendonça (2010) que obteve média de 1,3 mL. Na última coleta obteve-se o maior volume de ejaculado (T2 = 4,8 mL e T4 = 4,5 mL), porém, apesar de apresentarem a menor concentração espermática (T2 = 15×10^6 /ml e T4 = 30×10^6 /ml), observamos que ambas as amostras apresentavam quantidade semelhante ou superior às amostras obtidas na primeira e segunda coleta com relação aos espermatozoides totais (T2 = 72×10^6 e T4 = 135×10^6).

O valor médio do pH seminal foi de 7,29, valor próximo ao encontrado por Mendonça (2010), que foi de 7,44.

O valor médio da motilidade foi de 50% tendo os seus menores valores na última coleta para os dois tamanduás. Mendonça (2010) observou uma motilidade variando de 10% a 60%, resultando numa média de 33,18%.

O vigor médio foi de 2,17, valor aproximado ao encontrado por Mendonça (2010), que foi de 2,30. O baixo valor encontrado para o vigor provavelmente se deva ao fato do sêmen apresentar alta viscosidade, o que interfere na velocidade de deslocamento da célula espermática pelo fluido seminal (Mendonça, 2010).

Comparando os valores médios da concentração, observou-se que este foi de $33,33 \times 10^6$, valor inferior ao descrito por Mendonça (2010), que foi de $129,41 \times 10^6$; no entanto, a média de espermatozoides totais foi de $74,75 \times 10^6$. Essa variação

pode estar relacionada com a frequência de ejaculações, idade, tamanho testicular e ao tamanho das reservas de espermatozoides extragonadais (AX et. al., 2004).

A média total dos defeitos foi de 37%, estando abaixo da média descrita por Mendonça (2010) que foi de 64,53%, sendo que os dois tamanduás avaliados apresentaram uma média de defeitos totais bastante semelhantes ($T2 = 38 \pm 7,94$ e $T4 = 36,33 \pm 8,74$).

A média da porcentagem de espermatozoides vivos encontrada foi de $65 \pm 7,77\%$, apresentando correlação com a motilidade que foi de $50\% \pm 20$, indicando uma boa qualidade no sêmen,

uma vez que segundo Mendonça (2010) a motilidade máxima encontrada foi de 60%.

Conclusão

Os testes convencionais utilizados em animais domésticos e mamíferos selvagens mostraram-se eficientes para avaliação do sêmen em tamanduá-bandeira. Os testes preliminares para padronização da coloração eosina-nigrosina mostraram-se eficientes para avaliação da integridade da membrana plasmática de espermatozoides de tamanduás-bandeiras validando-o para utilização na espécie.

Agradecimentos

Zoológico da UFMT, por disponibilizar os animais para esta pesquisa.

Referências

- AX, R. L.; DALLY, M. R.; DIDION, B. A.; LENZ, R. W.; LOVE, C. C.; VARNER, D. D.; HAFEZ, B.; BELLIN, M. E. *Inseminação Artificial*. In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. (eds). *Reprodução Animal*. Barueri, SP: Manole, 2004. p. 369-379.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2. ed. Belo Horizonte, 2013.
- DEEM, S.L.; FIORELLO C.V. *Capture and immobilization of free-ranging edentates*. In: D. HEARD, (eds.). *Zoological restraint and anesthesia*. International Veterinary Information Service (www.ivis.org), Ithaca, New York, USA. 2002.
- DERIVAUX, J. *Reprodução dos animais domésticos*. Zaragoza: Acibia. 1980. 119 p.
- HOWARD, J.G. *Semen collection and analysis in nondomestic carnivores*. In: FOWLER, M.E.(ed) *Zoo and Wild Animal Medicine Current Therapy*. 3. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1993. p. 390-399.
- HOWARD, J.G.; BUSH, M.; WILDT, D.E. *Semen collection, analysis and cryopreservation in nondomestic mammals*. In: MORROW, D.A. (ed) *Current Therapy in Theriogenology*. 2. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1986, p.1047-1053.
- MEDRI, I. M.; MOURÃO, G. M.; RODRIGUES, F. H. G. *Ordem Xenarthra*. In: REIS, N. R.; PERACCHI, A. L. (eds) *Mamíferos do Brasil*. Londrina: Universidade Estadual de Londrina, 2006, Cap. 4, p. 71-75.
- MENDONÇA, M.A.C. Análise descritiva do perfil espermático do tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla* Linnaeus, 1758) de cativeiro. 2010. 81f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal). Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2010.
- MIES FILHO, A. *Reprodução dos animais e inseminação artificial*. Porto Alegre: Sulina. v. 2. p. 327-750, 1987.
- MIRANDA, F.; COSTA, A. M. *Xenarthra*. In: CUBAS, Z. S. e SILVA, J. C. R. (eds.) *Tratado de Animais Silvestres*. São Paulo: Roca, 2007. p. 402-414.
- MIRANDA, G. H. B. Giant Anteater (*Myrmecophaga tridactyla*) Beehive Foraging at Emas National Park, Brazil. *Edentata*, v. 5, p. 55, 2003.
- MIRANDA, G. H. B. Ecologia e conservação do tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla* Linnaeus, 1758) no Parque Estadual das Emas. 2004. 81f. Tese (Doutorado em Ecologia), Universidade de Brasília, Brasília, 2004.
- NASR-ESFAHANI, M.H.; ABOUTORABI, R.; ESFANDIARI, E. et al. Sperm MTT Viability Assay: A New Method for Evaluation of Human Sperm Viability. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v. 19, n.10, p. 477-482, 2002.
- OLIVEIRA, R.V.; NUNES, J.F.; SALGUEIRO, C.C.M. et al. A utilização de bromofenol como método de coloração vital para avaliação morfológica do espermatozóide ovino. *Ciência Animal Brasileira*, v.10, n. 3, p. 862-869, 2009.