

O Viagra® melhora a qualidade espermática em peixes?

Giulia Isabelle Ventura Monte RAZO; Marcos Natom Pereira DIAS;
George Shigueki YASUI; Mayra Elena Ortiz D'Ávila ASSUMPÇÃO

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ USP

giulia.monterazo@gmail.com

Objetivos

O citrato de sildenafil, comercialmente conhecido como Viagra®, é um agente vasoativo que promove o relaxamento do músculo liso e a vasodilatação por meio de cascatas enzimáticas. Dada a sua atuação sobre a vascularização e possíveis efeitos na fisiologia reprodutiva, este estudo tem como objetivo avaliar os efeitos do citrato de sildenafil sobre a qualidade seminal, utilizando como parâmetros a concentração espermática, a motilidade e a viabilidade dos espermatozoides.

Métodos e Procedimentos

Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com os padrões éticos do Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEUA) sob o número 6374120423.

Foram utilizados 20 exemplares de lambari-dorabo-amarelo *Astyanax altiparanae* ($5,94 \pm 0,21$ cm, $5,14 \pm 0,57$ g), distribuídos aleatoriamente em cinco aquários de 70 litros, mantidos a uma temperatura de 28°C, resultando em 5 tratamentos e 4 repetições. Cada aquário correspondeu a um grupo experimental, sendo: T1 = Controle (NaCl 0,9%); T2 = Hipófise desidratada de carpa (0,5 mg/kg); T3 = NaCl 0,9% + Viagra® (1,4 mg/kg); T4 = Viagra® (1,4 mg/kg); e T5 = Hipófise + Viagra® (0,5 mg/kg e 1,4 mg/kg, respectivamente). As aplicações intraperitoneais de hipófise desidratada de carpa e Viagra® foram diluídas em 0,9% NaCl e injetadas intraperitonealmente. A primeira aplicação foi realizada no tempo zero, e a de Viagra® foi realizada 2 horas antes da coleta seminal (4 horas após a primeira injeção). Para a coleta de sêmen, os animais foram anestesiados com óleo de cravo (200 mg/L), e as papilas genitais foram secas com papel absorvente. Por meio de massagem abdominal,

o sêmen foi extrusado e coletado com micropipeta de 1.000 µL, sendo imediatamente transferido para microtubos de 1,5 mL, contendo 400 µL de solução de Ringer modificado (NaCl 128,3 mM, KCl 23,6 mM, CaCl₂ 3,6 mM, MgCl₂ 2,1 mM) e mantida sob refrigeração (~4°C). A concentração espermática foi determinada por hemocitômetro.

A motilidade espermática foi observada em microscópio óptico após uma diluição de 20x com água destilada, e a movimentação dos espermatozoides e sequências de vídeo foram registradas por meio de uma câmera tipo CCD (Nikon DS-Fi, Tokyo, Japão) acoplada ao microscópio (Nikon NI, Tokyo, Japão). A partir dos vídeos, foram determinados a duração da motilidade, e análise computadorizada (CASA) (Wilson-Leedy & Ingermann, 2007) analisando-se os parâmetros de motilidade total e VCL.

A viabilidade espermática foi avaliada por citometria de fluxo (Accuri C6, BD Biosciences, San Jose, CA, EUA), utilizando coloração diferencial com os corantes SYBR-14 e iodeto de propídio (PI). As leituras foram realizadas pelos filtros FL1 (530 ± 15 nm) e FL3 (> 670 nm), permitindo a distinção entre espermatozoides viáveis e não viáveis. Os dados foram apresentados como média e erro padrão. As médias foram analisadas quanto à normalidade e sucedida por ANOVA e teste de Tukey para comparação múltipla das médias ($P < 0,05$).

Resultados

Os resultados estão explícitos na Tabela 1. O tratamento com hipófise isolada (T2) apresentou concentração espermática significativamente superior em relação ao grupo controle (T1) ($P = 0,0043$). Em contrapartida, os tratamentos que receberam o Viagra®, tanto isoladamente (T4), quanto em associação (T3 e T5), apresentaram concentrações menores em relação ao T2 ($P =$

0,0156, $P = 0,0229$ e $P = 0,0147$, respectivamente).

A associação entre hipófise e Viagra® (T5) promoveu considerável redução na viabilidade espermática em relação aos grupos T1 ($P = 0,0255$) e T3 ($P = 0,0303$).

Todos os grupos tratados com hipófise (T2) ou com Viagra® associado (T3 e T5) apresentaram motilidade espermática significativamente superior ao grupo controle (T1) ($P = 0,0010$, $P = 0,0038$ e $P = 0,0010$, respectivamente). Além disso, o grupo tratado com hipófise isolada (T2) apresentou maior motilidade quando comparada ao uso de Viagra® em T3 e T4 ($P = 0,0176$ e $P =$

$0,0010$). A associação de Viagra® com hipófise (T5) também resultou em motilidade superior ao Viagra® isolado (T4) ($P = 0,0010$).

A análise de velocidade curvilínea (VCL) não evidenciou diferenças estatísticas relevantes entre os grupos.

O tempo de motilidade espermática se mostrou significativamente superior em todos grupos quando comparados ao controle (T1), com valores P variando entre $0,0010$ e $0,0203$. A combinação de hipófise e Viagra® (T5) apresentou tempo de motilidade superior em relação ao observado em T4 ($P = 0,0071$).

Tabela 1: Parâmetros espermáticos de lambari *Astyanax altiparanae*, injetados com 0,9% NaCl, hipófise desidratada de carpa (0,5 mg/kg) e/ou Viagra® (1,4 mg/kg). Os dados são referentes a 4 repetições. Letras diferentes em colunas denotam diferenças pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Tratamento	Viabilidade (%)	Tempo de Motilidade (s)	Motilidade (%)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	Concentração (espermatozoides/mL)
NaCl 0,9% (T1)	90,92 $\pm$ 2,48 ^a	23,00 $\pm$ 2,04 ^a	6,57 $\pm$ 4,06 ^a	59,28 $\pm$ 1,70 ^a	0,30 $\pm$ 0,10 $\times 10^{8a}$
Hipófise 0,5 mg/kg (T2)	89,15 $\pm$ 0,79 ^a	49,75 $\pm$ 1,88 ^b	51,48 $\pm$ 6,55 ^b	69,95 $\pm$ 5,60 ^a	5,49 $\pm$ 1,77 $\times 10^{8b}$
NaCl 0,9% + Viagra® 1,4 mg/kg (T3)	90,60 $\pm$ 1,15 ^a	46,50 $\pm$ 3,92 ^b	31,24 $\pm$ 1,14 ^{bc}	54,78 $\pm$ 3,45 ^a	1,33 $\pm$ 0,48 $\times 10^{8a}$
Viagra® 1,4 mg/Kg (T4)	88,75 $\pm$ 1,43 ^a	39,50 $\pm$ 5,10 ^b	18,30 $\pm$ 2,03 ^{ac}	61,32 $\pm$ 1,66 ^a	1,09 $\pm$ 0,36 $\times 10^{8a}$
Hipófise 0,5 mg/kg + Viagra® 1,4 mg/Kg (T5)	78,56 $\pm$ 4,68 ^b	58,50 $\pm$ 2,10 ^c	47,21 $\pm$ 3,55 ^b	58,88 $\pm$ 4,40 ^a	1,05 $\pm$ 0,21 $\times 10^{8a}$

Conclusão

Os resultados indicam que o uso isolado de hipófise, considerado procedimento padrão na indução reprodutiva de peixes, otimizou a qualidade seminal. Sendo assim, conforme a metodologia utilizada, o uso do Viagra® isolado ou como adjuvante da hipófise não são recomendados.

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Agradecimentos

Os autores são gratos à CTG Brasil (Projeto #PD-00387-0418/2019) pelo incentivo à pesquisa.

Referências

ROCHA, Nathalia Alcântara et al. Acute exposure to hyperosmotic conditions reduces

sperm activation by urine in the yellowtail tetra *Astyanax altiparanae*, a freshwater teleost fish. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 57, n. 3, p. e166205-e166205, 2020.

SCHERZER, Nickolas D.; LE, Tan V.; HELLSTROM, Wayne JG. Sildenafil's impact on male infertility: what has changed in 20 years?. **International Journal of Impotence Research**, v. 31, n. 2, p. 71-73, 2019.

Wilson-Leedy JG, Ingermann RL. Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. **Theriogenology**: v. 67, n.3):661-72, 2007.

YASUI, George Shigueki et al. Improvement of gamete quality and its short-term storage: an approach for biotechnology in laboratory fish. **Animal**, v. 9, n. 3, p. 464-470, 2015.

Can Viagra® improve sperm quality in fish?

Giulia Isabelle Ventura Monte RAZO; Marcos Natom Pereira DIAS;
George Shigueki YASUI; Mayra Elena Ortiz D'Ávila ASSUMPÇÃO

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ USP

giulia.monterazo@gmail.com

Objectives

Sildenafil citrate, commercially known as Viagra®, is a vasoactive agent that promotes smooth muscle relaxation and vasodilation through enzymatic cascades. Given its action on vascularization and potential effects on reproductive physiology, this study aimed to evaluate the effects of sildenafil citrate on sperm quality, using sperm concentration, motility, and viability as parameters.

Materials and Methods

All procedures were conducted in accordance with the ethical standards of the Animal Research Ethics Committee (CEUA) under protocol number 6374120423.

Twenty specimens of yellowtail tetra *Astyanax altiparanae* (5.94 ± 0.21 cm, 5.14 ± 0.57 g) were randomly distributed into five 70-liter aquarium, set at 28°C, resulting in 5 treatments and 4 replicates. Each aquarium corresponded to one experimental group: T1 = Control (NaCl 0.9%); T2 = dehydrated carp pituitary (0.5 mg/kg); T3 = NaCl 0.9% + Viagra® (1.4 mg/kg); T4 = Viagra® (1.4 mg/kg); and T5 = dehydrated carp pituitary + Viagra® (0.5 mg/kg and 1.4 mg/kg, respectively). Intraperitoneal injections of dehydrated carp pituitary gland and Viagra® were diluted in 0.9% NaCl. The first application was performed at time zero, while Viagra® was administered 2 hours before sperm sampling (4 hours after the first injection). For sperm sampling, the fish were anesthetized with clove oil (200 mg/L), and the genital papillae was dried with paper. Sperm was released by stripping and immediately collected using a 1,000 µL micropipette and transferred to 1.5 mL microtubes containing 400 µL of modified Ringer's solution (NaCl 128.3 mM, KCl 23.6 mM, CaCl₂ 3.6 mM, MgCl₂ 2.1 mM) and kept

refrigerated (~4°C). Sperm concentration was determined using a hemocytometer.

Sperm motility was observed under a light microscope after a 20-fold dilution in distilled water, and video sequences of sperm motility were recorded using a CCD camera (Nikon DS-Fi, Tokyo, Japan) attached to a microscope (Nikon NI, Tokyo, Japan). From the videos, motility duration was measured, and computer-assisted sperm analysis (CASA) was performed (Wilson-Leedy & Ingermann, 2007), evaluating total motility and VCL parameters.

Sperm viability was assessed by flow cytometric analysis (Accuri C6, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) using dual-staining with SYBR-14 and propidium iodide (PI). Analysis was performed with FL1 (530 ± 15 nm) and FL3 (> 670 nm) filters, distinguishing viable from non-viable spermatozoa. Data were expressed as mean and standard error. Means were tested for normality and then analyzed by ANOVA followed by Tukey's test for multiple analysis ($P > 0.05$).

Results

The results are shown in Table 1. Treatment with single dose of pituitary (T2) presented significantly higher sperm concentration compared with control group (T1) ($P = 0.0043$). On the other hand, treatments with Viagra® (T4) or in association (T3 and T5), showed lower concentrations compared to T2 ($P = 0.0156$, $P = 0.0229$, and $P = 0.0147$, respectively).

The association between pituitary and Viagra® (T5) significantly reduced sperm viability compared to T1 ($P = 0.0255$) and T3 ($P = 0.0303$).

Every group treated with pituitary (T2) or combined with Viagra® (T3 and T5) presented significantly higher sperm motility than control group (T1) ($P = 0.0010$, $P = 0.0038$, and $P = 0.0010$, respectively). Additionally, pituitary (T2)

induced increased motility compared to Viagra® in T3 and T4 ($P = 0.0176$ and $P = 0.0010$). The combination of Viagra® with pituitary (T5) also resulted in higher motility than Viagra® (T4) ($P = 0.0010$).

Curvilinear velocity (VCL) analysis did not reveal statistically relevant differences between all the treatments.

Sperm motility duration was significantly higher in all groups compared to the control (T1), with P values ranging from 0.0010 to 0.0203. The combination of pituitary and Viagra® (T5) showed prolonged motility duration compared to T4 ($P = 0.0071$).

Table 1. Sperm parameters of yellowtail tetra *Astyanax altiparanae* injected with 0.9% NaCl, carp pituitary extract (0.5 mg/kg), and/or Viagra® (1.4 mg/kg). Data are from 4 replicates. Different letters in the same column indicate significant differences by Tukey's test ($P < 0.05$).

Treatment	Viability (%)	Motility Duration (s)	Motility (%)	VCL (µm/s)	Concentration (sperm/mL)
NaCl 0.9% (T1)	90.92 ± 2.48 ^a	23.00 ± 2.04 ^a	6.57 ± 4.06 ^a	59.28 ± 1.70 ^a	0.30 ± 0.10 × 10 ^{8a}
Pituitary 0.5 mg/kg (T2)	89.15 ± 0.79 ^a	49.75 ± 1.88 ^b	51.48 ± 6.55 ^b	69.95 ± 5.60 ^a	5.49 ± 1.77 × 10 ^{8b}
NaCl 0.9% + Viagra® 1.4 mg/kg (T3)	90.60 ± 1.15 ^a	46.50 ± 3.92 ^b	31.24 ± 1.14 ^{bc}	54.78 ± 3.45 ^a	1.33 ± 0.48 × 10 ^{8a}
Viagra® 1.4 mg/Kg (T4)	88.75 ± 1.43 ^a	39.50 ± 5.10 ^b	18.30 ± 2.03 ^{ac}	61.32 ± 1.66 ^a	1.09 ± 0.36 × 10 ^{8a}
Pituitary 0.5 mg/kg + Viagra® 1.4 mg/Kg (T5)	78.56 ± 4.68 ^b	58.50 ± 2.10 ^c	47.21 ± 3.55 ^b	58.88 ± 4.40 ^a	1.05 ± 0.21 × 10 ^{8a}

Conclusion

The results indicate that the use of pituitary, considered the standard procedure for induced spawning in fish, optimized seminal quality. Therefore, using the procedures above, the use of Viagra®, or as an adjuvant to pituitary is not recommended.

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors are grateful to CTG Brasil (Project #PD-00387-0418/2019) for supporting this research.

References

- ROCHA, Nathalia Alcântara et al. Acute exposure to hyperosmotic conditions reduces sperm activation by urine in the yellowtail tetra *Astyanax altiparanae*, a freshwater teleost fish. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 57, n. 3, p. e166205-e166205, 2020.
- SCHERZER, Nickolas D.; LE, Tan V.; HELLSTROM, Wayne JG. Sildenafil's impact on male infertility: what has changed in 20 years?.

International Journal of Impotence Research, v. 31, n. 2, p. 71-73, 2019.

Wilson-Leedy JG, Ingermann RL. Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. **Theriogenology**: v. 67, n.3):661-72, 2007.

YASUI, George Shigueki et al. Improvement of gamete quality and its short-term storage: an approach for biotechnology in laboratory fish. **Animal**, v. 9, n. 3, p. 464-470, 2015.