

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

USO DE SÊMEN LIOFILIZADO DE GATOS DOMÉSTICOS (*Felis
silvestris catus*) PARA A PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES
ATRAVÉS DA TÉCNICA DE INJEÇÃO INTRACITOPLASMÁTICA
DE ESPERMATOZÓIDE (ICSI)

LUIS CARLOS OÑA MAGALHÃES

Botucatu-SP

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

USO DE SÊMEN LIOFILIZADO DE GATOS DOMÉSTICOS (*Felis
silvestris catus*) PARA A PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES
ATRAVÉS DA TÉCNICA DE INJEÇÃO INTRACITOPLASMÁTICA
DE ESPERMATOZÓIDE (ICSI)

LUIS CARLOS OÑA MAGALHÃES

Tese apresentada junto ao Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia Animal
para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Prof^ª Titular Maria Denise Lopes

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Magalhaes, Luis Carlos Oña.

Uso de sêmen liofilizado de gatos domésticos (*Felis silvestris catus*) para a produção in vitro de embriões através da técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI) / Luis Carlos Oña Magalhaes. - Botucatu, 2013

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Maria Denise Lopes

Capes: 50504002

1. Felideo - Reprodução. 2. Tecnologias reprodutivas. 3. Fertilização in vitro.
4. Sêmen.

Palavras-chave: *Felis silvestris catus*; ICSI; PIV; Sêmen liofilizado.

Nome do autor: Luis Carlos Oña Magalhães

Título: USO DE SÊMEN LIOFILIZADO DE GATOS DOMÉSTICOS (*Felis silvestris catus*) PARA A PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES ATRAVÉS DA TÉCNICA DE INJEÇÃO INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZÓIDE (ICSI)

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a Titular Maria Denise Lopes
Presidente e Orientadora
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof^a Titular Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga
Membro
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

PhD Dra. Jussara Maria Tebet
Membro
Secretaria de Estado do Meio Ambiente (SMA)
Núcleo de Programas e Projetos de Bauru (NRPP6)

Profa Associada Maria Isabel Mello Martins
Membro
Departamento de Clínicas Veterinárias
Universidade Estadual de Londrina – PR.

PhD Dra. Camila de Paula Freitas Dell'Aqua
Membro
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Data da Defesa: 02 de Dezembro de 2013

DEDICATÓRIA

À minha esposa e filho que sempre estiveram ao meu lado durante todo o período do doutorado.

Aos meus pais e irmão que fizeram parte de toda minha criação e que fizeram de mim o que sou.

AGRADECIMENTOS

À todos que de uma forma ou de outra contribuíram para que a elaboração dessa tese se concretizasse.

À Deus que me deu força quando eu mais precisei para executar esse trabalho.

À minha esposa por ficar ao meu lado durante todos os momentos.

Ao meu filho por mostrar que as coisas simples da vida possuem o maior valor do mundo.

Aos meus pais que me ensinaram virtudes que busco passar para todos que convivem comigo.

Ao meu irmão que em meio a suas dificuldades sempre acreditou em mim.

Aos médicos da Faculdade de Medicina de Botucatu que nos deram suporte com meu filho de forma a possibilitar minha paz de espírito para realizar esse experimento.

À minha orientadora Profa. Maria Denise Lopes que em nenhum momento deixou de acreditar em minha capacidade de cumprir as metas por ela estabelecidas.

À Profa. Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga que sempre ajudou nos momentos em que tínhamos grandes empasses na execução do experimento.

Ao Prof. José Buratini Junior que gentilmente cedeu o espaço e o micromanipulador para que parte do experimento fosse realizado.

Aos docentes do Departamento de Reprodução Animal que me ensinaram muito mais que valores didáticos, ensinaram valores humanos.

Aos funcionários da Faculdade de Medicina Veterinária de Botucatu que me ajudaram nos cuidados com os animais, equipamentos e instalações.

Aos meus amigos e colegas de laboratório que me deram apoio e ajudaram neste experimento.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

“A persistência é o menor caminho do êxito”

Charles Chaplin

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Médias ($\pm$ desvio padrão) obtidas para as características espermáticas do sêmen (fresco e descongelado) de gato através do CASA	45
TABELA 2	Resultado da avaliação da integridade de DNA de células espermáticas de gato provenientes de sêmen fresco, descongelado e liofilizado utilizando a sonda fluorescente de Laranja de Acridina convencional, ensaio do Cometa, Laranja de Acridina na citometria de fluxo (IDF) e TUNEL.....	46
TABELA 3	Média e desvio padrão do número de Complexo <i>Cumulus Oophorus</i> (CCOs) de grau I antes e após expansão das células do cúmulo.....	47
TABELA 4	Produção de blastocistos utilizando sêmen fresco, descongelado e liofilizado apresentados em porcentagem (%).....	47

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Ovários de gata submetida à OSH eletiva e transportados em tubo de centrifugação para o laboratório.....	36
FIGURA 2	Técnica de <i>slicing</i> (fatiamento) para a recuperação de oócitos de gata.....	37
FIGURA 3	Graus variados de CCOs de gata	37
FIGURA 4	CCOs de grau I de gata. (Microscópio de luz, aumento 400x).....	37
FIGURA 5	CCO de grau I de gata. (Microscópio de luz, aumento 400x)	37
FIGURA 6	Placa do tipo <i>four-well</i> com 400µL de meio MIV para maturação de oócitos de gata.....	38
FIGURA 7	CCOs de grau I de gata com expansão de células do <i>cumulus</i>	39
FIGURA 8	Placa de petri com gotas de meio SOFaa cobertas com óleo mineral.....	40
FIGURA 9	Micromanipulador para realizar o procedimento de ICSI.....	41
FIGURA 10	Micropipetas de retenção e injeção.....	41
FIGURA 11	Momento de injeção de espermatozóide de gato doméstico no oolema.....	42

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

μL = microlitro

μm = micrômetro ou microns

$^{\circ}\text{C}$ = graus Célsius

BSA = albumina sérica bovina

Ca^{2+} = cálcio

CASA = análise computadorizada do movimento espermático

CCO = Complexo Cumulus-Oophorus

CO_2 = dióxido de carbono

D = dia

DMSO = dimetilsulfóxido

DNA = ácido desoxirribonucléico

DPBS = *Dulbecco's phosphate buffered saline*

EDTA = ácido etileno diamino tetracético

EGTA = ácido etileno glicol tetracético

FIV = fertilização *in vitro*

HCl = cloreto de hidrogênio

IA = inseminação artificial

ICSI = injeção intracitoplasmática de espermatozóide

IDF = índice de fragmentação de DNA

LA = laranja de acridina

mA = miliampere

mg = miligrama

Mg²⁺ = magnésio

MII = metáfase II

MIV = maturação *in vitro*

MJ/kg = megajoule por quilograma

mL = mililitro

mm = milímetro

mM = milimolar

N₂ = nitrogênio

NaCl = cloreto de sódio

NaOH = hidróxido de sódio

O₂ = oxigênio

OSH = ovariossalpingohisterectomia

PBS = *Phosphate Buffered Saline*

pH = potencial de hidrogênio

PIV = produção *in vitro*

qsp = quantidade suficiente para

SCGE = *Single-Cell Gel Eletrophoresis*

SCSA = *Sperm Chromatin Structure Assay*

SFB = soro fetal bovino

SOF = *Synthetic Oviductal Fluid*

SOFaa = *Synthetic Oviductal Fluid* acrescido de aminoácidos

TALP = *Tyrodé albumin lactate pyruvate medium*

TE = transferência de embrião

Tris = trishidroximetilaminometano

TUNEL = *Terminal Uridine Nick End Labelling*

UI = unidade internacional

V = volts

VS = versus

Magalhães, L.C.O.M. **Uso de sêmen liofilizado de gatos domésticos (*Felis silvestris catus*) para a produção *in vitro* de embriões através da técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI)**. Botucatu, 2013. 107p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

A produção de embrião *in vitro* (PIV) tem sido uma grande alternativa para os programas de preservação de felídeos selvagens ameaçados de extinção. No entanto, a PIV necessariamente depende de outras técnicas de reprodução assistida como a maturação *in vitro* (MIV), fertilização *in vitro* (FIV), transferência de embrião (TE), e criopreservação de gametas. Essas técnicas de reprodução assistida já foram transferidas com sucesso do gato doméstico para seus parentes selvagens. Já o uso de sêmen liofilizado também resultou em filhotes vivos de diversas espécies de produção, mas em gatos domésticos isso ainda não ocorreu. O objetivo do presente estudo foi verificar a fragmentação do DNA do sêmen liofilizado e a viabilidade de seu uso através da utilização da ICSI para a PIV de embriões de gatos domésticos. Foram colhidas amostras de 3 gatos normospermicos que foram utilizadas a fresco, congeladas/descongeladas e liofilizadas. Foram realizados testes para avaliação de integridade de DNA (Laranja de Acridina Convencional, Ensaio do Cometa Alcalino, Laranja de Acridina na citometria de fluxo, e TUNEL). O método de TUNEL mostrou ter maior sensibilidade para detecção de fragmentação de DNA e detectou grau elevado de lesão de DNA do sêmen liofilizado em comparação com o sêmen fresco e congelado/descongelado dos mesmos doadores. Não foi possível produzir embrião de gato através da técnica de ICSI utilizando sêmen que foi liofilizado em meio SOF.

Palavras chave: PIV, *Felis silvestris catus*, sêmen liofilizado, ICSI.

Magalhães, L.C.O.M. **Use of freeze-dried cat sperm for the in vitro production of embryos by using intracytoplasmic sperm injection (ICSI)**. Botucatu, 2013. 107p. Thesis (Doctoral degree) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu Campus, São Paulo State University.

ABSTRACT

The *in vitro* production of embryos (IVP) has been a good alternative for conservational programmes of wild felids threatened by extinction. However, IVP depends upon several other assisted reproduction techniques such as *in vitro* maturation (IVM), *in vitro* fertilization (IVF), embryo transfer (ET), gamete cryopreservation. These techniques were already successfully employed in wild felines. Freeze-dried sperm has also been used to produce live offspring of several species, but in domestic cat this has not been reported yet. Hence, the objective of the present study was to verify the sperm DNA fragmentation after the freeze-drying process as well as the feasibility of using freeze-dried sperm together with ICSI to produce cat IVP embryos. Fresh, frozen/thawed, freeze-dried sperm samples of 3 normospermic cats were used in this experiment. Sperm DNA integrity assessments were performed (Conventional Acridine Orange, Alkaline Comet Assay, Acridine Orange using flow cytometry, and TUNEL). TUNEL assessment showed higher sensitivity to detect DNA fragmentation and it detected higher DNA fragmentation in freeze-dried sperm when compared to frozen/thawed and fresh semen from the same donors. It was not possible to produce IVP embryos making use of freeze-dried sperm that used SOF as medium and ICSI.

Keywords: IVP, *Felis silvestris catus*, freeze-dried sperm, ICSI.

SUMÁRIO

RESUMO.....	12
1. Introdução.....	16
2. Revisão de literatura.....	19
3. Objetivo.....	27
3.1 Objetivo geral.....	28
3.2 Objetivos específicos.....	28
4. Material e métodos.....	29
4.1 Local.....	30
4.2 Comitê de ética.....	30
4.3 Animais.....	30
4.4 Colheita e manipulação do sêmen.....	31
4.4.1 Concentração espermática.....	31
4.4.2 Avaliação computadorizada da cinética espermática.....	31
4.5 Liofilização do sêmen.....	32
4.6 Laranja de Acridina.....	32
4.7 Ensaio do Cometa Alcalino.....	33
4.8 Teste de avaliação da integridade da cromatina espermática realizada por citometria de fluxo	34
4.8.1 Avaliação da suscetibilidade à fragmentação de DNA utilizando Laranja de Acridina na citometria de fluxo.....	35
4.8.2 TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)- mediated dUTP nick end labeling).....	35

4.9 Obtenção e transporte de ovários.....	36
4.10 Recuperação e seleção de oócitos.....	37
4.11 Maturação <i>in vitro</i> de oócitos.....	38
4.12 Fertilização <i>in vitro</i>	38
4.13 Injeção intracitoplasmática de espermatozóide.....	41
4.14 Cultivo <i>in vitro</i> (CIV) de embriões.....	42
4.15 Análise estatística.....	43
5. Resultados.....	44
5.1 Avaliação computadorizada da cinética espermática.....	45
5.2 Avaliação da fragmentação de DNA realizada por Teste de Laranja de Acridina Convencional, Ensaio do Cometa, e citometria de fluxo....	46
5.3 Maturação oociária <i>in vitro</i>	47
5.4 Produção de embriões <i>in vitro</i>	47
6. Discussão.....	48
7. Conclusão.....	57
8. Bibliografia.....	59
9. Trabalho publicado.....	74
10. Trabalho submetido.....	83
Anexos.....	104

Introdução

1) Introdução

A produção de embrião *in vitro* (PIV) é uma alternativa para os programas de preservação de felídeos selvagens ameaçados de extinção (LOSKUTOFF et al., 1995), uma vez que para muitos desses animais, quando em cativeiro, a reprodução natural encontra barreiras devido à incompatibilidades comportamentais e genéticas (MELLON, 1991). A PIV depende de outras técnicas de reprodução assistida como a maturação *in vitro* (MIV), fertilização *in vitro* (FIV), transferência de embrião (TE), e criopreservação de gametas e é nesse contexto que o gato doméstico (*Felis silvestris catus*) é utilizado como modelo experimental.

Exemplos do rápido progresso de técnicas de reprodução assistida (SOARES et al., 2002) no gato doméstico incluem o nascimento de filhotes após transferência de embriões frescos produzidos por FIV em tubas uterinas (GOODROWE et al., 1988) ou intrauterina (POPE et al., 1993), transferência intrauterina de embriões produzidos *in vivo* (DRESSER et al., 1988) ou por FIV (POPE et al., 1994a) após criopreservação de sêmen, e ainda a partir de embriões produzidos por injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) de oócitos vitrificados (POPE et al., 2012).

Essas técnicas de reprodução assistida podem ser transferidas do gato doméstico para seus parentes selvagens como já foi descrito por Swanson (2012). O nascimento de produtos de transferência interespecie de gato do deserto Indiano (*Felis silvestris ornata*) para receptoras de gato doméstico (POPE et al., 1993) e transferência intraespecie de embriões de tigre (*Panthera tigris*) (DONOGHUE et al., 1990) já foram descritos também. Embriões de outras espécies de felídeos já foram produzidos *in vitro*, no entanto, a taxa de fertilização e clivagem é geralmente menor que a obtida em gatos domésticos (GOODROWE et al., 1989; MILLER et al., 1990; DONOGHUE et al., 1992; POPE et al., 1993).

Falhas de fertilização na espécie felina geralmente ocorrem devido à baixa qualidade seminal (POPE et al. 1993). A baixa qualidade de sêmen é uma característica particular de muitos felídeos selvagens (WILDT et al., 1988; LUVONI, 2000; POPE, 2000) se constituindo em um fator limitante para o uso de técnicas como a IA e FIV em programas de conservação e gerenciamento de espécies (WILDT et al., 1992; TSUITSUI et al., 2011). A fertilização assistida por

micromanipulação, especificamente pela ICSI revolucionou o tratamento de pacientes inférteis que apresentavam a infertilidade masculina como principal problema. Atualmente a ICSI tem sido utilizada como técnica padrão na maioria das clínicas de fertilidade humana (BETTERIDGE e REIGER, 1993). A frequência de fertilização e clivagem após a ICSI é semelhante àsquelas de pacientes submetidos à FIV e que não apresentam a infertilidade masculina como fator limitante (VAN STEIRTEGHEM et al.,1993). No entanto, a baixa proporção de blastocistos obtida através da FIV após o cultivo de embrião é ainda inferior quando se realiza a ICSI (PROBST e RATH, 2003). É importante lembrar que o procedimento de ICSI tem sido utilizado na espécie felina com um protocolo já bem definido (SWANSON, 2012).

A liofilização é uma das técnicas mais recentes de conservação de células espermáticas, que visa o armazenamento de material genético por longos períodos de tempo em temperatura ambiente ou a 4°C, sendo assim não há necessidade do uso de nitrogênio líquido. Além disso o sêmen liofilizado facilita o transporte de amostras de sêmen uma vez que podem ser mantidas em pequenos frascos ou mesmo em envelopes convencionais de correio. A produção de descendentes vivos e sadios de algumas espécies já foi descrita na literatura utilizando sêmen liofilizado (WAKAYAMA e YANAGIMACHI, 1998; HAMANO et al., 1999; KUSAKABE et al., 2001; KANEKO et al., 2003; NAKAI et al., 2003; LIU et al., 2004; KAWASE e SUZUKI, 2011).

Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi verificar a possibilidade de produzir embriões de gatos domésticos utilizando sêmen liofilizado por meio da técnica de ICSI.

Revisão de literatura

2) Revisão de literatura

A produção de embriões *in vitro* ganhou aliados para auxiliar no processo de conservação de espécies: a utilização da ICSI e a conservação de gametas masculinos através da técnica de liofilização. No entanto, poucas espécies até o momento se beneficiaram com a associação destes dois procedimentos, sendo: murino (WAKAYAMA e YANAGIMACHI, 1998), leporino (LIU et al., 2004), bovino (HAMANO et al., 1999) e suíno (NAKAI et al., 2003).

O gato doméstico vem sendo utilizado como modelo experimental para a reprodução de outras espécies de felídeos e para controle de inúmeras doenças que poderiam ser veiculadas através da monta natural uma vez que apresenta protocolos de IA e ICSI bem estabelecidos (SWANSON, 2012).

A formação de um banco de germoplasma é uma das principais estratégias de conservação das espécies, por permitir o aumento da variabilidade genética. Novas biotecnologias da reprodução vêm sendo aplicadas à espécie felina, e os resultados têm servido como base para conservação de felídeos silvestres, principalmente para aqueles ameaçados de extinção (LUVONI, 2000; NAGANO et al., 2008); o desenvolvimento de técnicas cada vez menos invasivas tem auxiliado à vencer os desafios relacionados à reprodução assistida em felinos, assim como diminuem o desconforto dos procedimentos visando o bem estar animal (SWANSON, 2012).

Para a realização de PIV é preciso conduzir outras técnicas de reprodução assistida como a colheita, classificação e seleção de oócitos, colheita e processamento de sêmen, MIV, FIV e em alguns casos a ICSI. Sendo assim, é de grande valia o estabelecimento de cada uma das etapas, já que o insucesso de qualquer uma delas resultaria na falha de produção de embriões.

Estudos recentes demonstram que inúmeros fatores podem exercer influência sobre a habilidade ou competência dos oócitos se desenvolverem *in vitro*: a origem dos ovários, a idade da doadora, a fase reprodutiva, o momento da colheita dos oócitos (FARSTAD, 2000), a nutrição da fêmea, o estresse e a composição do fluido folicular (KRISHER, 2013). A técnica mais utilizada para a recuperação de oócitos de gato doméstico é o fatiamento ("slicing") (TSUJIOKA et al., 2008; COMIZZOLI et al., 2009; RASCADO, 2009), onde se utiliza uma lâmina

de bisturi para o isolamento dos complexos *cumulus-oophorus* (CCOs) em placa de petri contendo meio de maturação (TSUJIOKA et al., 2008; RASCADO, 2009). Os oócitos também podem ser obtidos através da aspiração utilizando agulha acoplada a seringa e raspagem dos folículos utilizando lâmina de bisturi (MORO e SALAMONE, 2010; HOBBS et al., 2012).

Os CCOs com formato esférico, contornos visíveis das células da granulosa, citoplasma uniforme e fortemente pigmentado, zona pelúcida intacta (sem defeitos ou rupturas), envoltos por cinco ou mais camadas de células do *cumulus* firmemente aderidas garantem o maior sucesso da maturação oocitária (POPE et al., 1997; GODARD et al., 2008; TSUJIOKA et al., 2008; COMIZZOLI et al., 2009, RASCADO, 2009).

Diversos meios para maturação de oócitos são propostos, mas a eficiência deles é avaliada pela competência em produzir embriões e a avaliação morfológica dos embriões produzidos. Alguns dos métodos utilizados para a avaliação dos meios são: proporção de oócitos maduros após MIV, embriões produzidos após FIV, tempo de clivagem, porcentagem de blastocistos e número de blastômeros (HRIBAL et al., 2013).

Na MIV de óocitos de gatos domésticos espera-se uma maior incidência de metáfase II (MII) entre 40–48h do início do processo de maturação, que corresponde ao período de tempo da cobertura até a ovulação na gata (GOODROWE et al., 1989). No entanto, alguns estudos revelaram que a maioria dos oócitos atingem MII entre as primeiras 24h de MIV, e a inseminação às 40 horas ou ainda posterior a isso não resulta no desenvolvimento até blastocisto (LUVONI e OLIVA, 1993; WOLFE e WILDT, 1996).

O estágio do ciclo estral e a suplementação de meio de maturação com gonadotrofinas (GOODROWE et al., 1991, SCHRAMM e BAVISTER, 1995; WOOD et al., 1995, POPE et al., 1997) e a qualidade do CCO (WOOD e WILDT, 1997) influenciam o desenvolvimento in vitro.

A porcentagem de MIV é relativamente alta em oócitos de gatas (40–60%) dependendo da qualidade do oócito e tipo de suplementação hormonal. Os oócitos obtidos durante fotoperíodo longo necessitam de uma quantidade menor de FSH que aqueles obtidos em fotoperíodo curto (HOBBS et al., 2012).

Lopes et al. (2004) avaliaram a MIV de gatas púberes e pré-púberes e obtiveram taxas de MIV de 44,68 e 25,32% respectivamente para fêmeas púberes e pré-púberes, sendo um indicativo de que existe influência da puberdade na capacitação e desenvolvimento *in vitro*.

Para realizar a FIV é necessário a colheita de sêmen que pode ser realizada através da utilização de vagina artificial (SOJKA et al., 1970; VILLAVERDE, 2007) eletro-ejaculação (HOWARD et al., 1986) ou ainda a castração (espermatozoides do epidídimo) (FILLIERS et al., 2010). A penetração de espermatozoide se inicia 30 minutos após co-incubação e mais de 90% dos oócitos são penetrados de 30 minutos a 3 horas após co-incubação (POPE et al., 1998).

Os primeiros blastocistos de gato originados de MIV/FIV foram obtidos de oócitos fertilizados após 24h de MIV (POPE et al., 1994b; WOLFE e WILDT, 1996; WOOD e WILDT, 1997; POPE et al., 1997). No entanto, Wolfe e Wildt (1996) verificaram que a FIV após 32h de maturação obteve uma taxa maior de blastocistos do que aquela realizada após 24h (24% e 13%, respectivamente).

A taxa de FIV (clivagem) de oócitos nas gatas varia entre 40% e 50% em oócitos maturados *in vitro* e 60–80% para maturados *in vivo* (POPE et al., 1999). A FIV em gato doméstico vem apresentando sucesso na produção tanto de embriões, como de filhotes (GOODROWE et al., 1989; HOFFERT et al., 1997; SWANSON, 2012). Em alguns felídeos selvagens como o guepardo (*Acinonyx jubatus*) e o gato do deserto índico (*F. silvestris*) a técnica de FIV mostrou ser capaz de produzir embriões (POPE et al., 1989; DONOGUE et al., 1992, SWANSON, 2012), e no caso do tigre (*Panthera tigris*) foi capaz de produzir filhotes (DONOGHUE et al., 1990).

Uma grande porcentagem de embriões felinos produzidos *in vitro* apresenta um bloqueio de desenvolvimento no estágio entre mórula e blastocisto, período mais tardio do que o bloqueio ocorrido em outros mamíferos (DONOGHUE et al., 1990; JOHNSTON et al., 1991; ROTH et al., 1994; SWANSON et al., 1996; HOFFERT et al., 1997). Uma diferença no metabolismo da glicose foi demonstrada entre os oócitos de gata maturados *in vivo* e *in vitro*, e isso pode explicar parcialmente o bloqueio visto nos embriões (SPINDLER e WILDT, 1999).

Pope et al. (1999) observaram que tanto a suplementação de cisteína ao

meio de maturação como a redução da atmosfera de O₂ melhoraram significativamente o desenvolvimento de embriões *in vitro* até o estágio de blastocisto. Portanto, assim como na FIV de bovinos, os oócitos de gata maturados *in vitro* não se desenvolvem até blastocistos tão rapidamente como os oócitos maturados *in vivo*, mas a diferença é mínima devido aos avanços ocorridos nas condições de cultivo (SWANSON, 2006).

A ICSI é uma das técnicas de reprodução assistida mais caras, em razão do uso do micromanipulador, mas é também a técnica que pode apresentar a maior taxa de sucesso na concepção de embriões devido à precisão com que a fecundação é conduzida (SILVA, 2009). A ICSI consiste na injeção de um espermatozoide dentro de um oócito maduro. No momento da ICSI deve-se atentar à posição do corpúsculo polar mantendo-o à posição de “6” ou “12 horas”. A agulha/pipeta de injeção deve assumir a posição de “3 horas” (BOGLIOLO et al., 2001), e assim transpassar a zona pelúcida por compressão mecânica ou com o auxílio de pulsos elétricos (piezo) de intensidade 1 ou 2 (KIMURA e YANAGIMASHI, 1995). A fecundação será bem sucedida quando o DNA espermático estiver intacto e em uma forma condensada e estável. Esta técnica se aplica aos casos de espermatozoides imóveis, bem como de espermatozoides oriundos do epidídimo com baixa motilidade (SILVA et al., 2008) e liofilizados (MAGALHÃES, 2010).

De acordo com Pope et al. (1998) a ICSI possui resultados de fertilização semelhantes aos da FIV (58,1% vs 67,9% respectivamente para ICSI e FIV) e pode ser utilizada na conservação das espécies em extinção, especialmente nos casos onde existe uma baixa qualidade espermática excluindo a possibilidade da FIV (GOMEZ et al., 2000). No entanto, possíveis diferenças de "competência" entre oócitos maturados *in vitro* ou *in vivo*, pode afetar os resultados após a injeção do espermatozoide.

O sucesso da ICSI com oócitos maturados *in vitro* pode ser afetada por fatores como deficiência na síntese de proteínas e na sinalização anormal do cálcio (PLACHOT, 1999), metabolismo retardado da glicólise (SPINDLER et al. 2000), ou de diferenças bioquímicas (KHURANA e NIEMANN, 2000). Tais diferenças podem se refletir em uma menor frequência na ativação dos oócitos, menor descondensação da cromatina espermática e pior desenvolvimento embrionário.

Após a realização da FIV ou ICSI, se faz necessário o cultivo dos embriões *in vitro* para que eles se desenvolvam até o estágio de blastocisto expandido, quando estarão prontos para serem transferidos para uma fêmea receptora (POPE et al., 2006).

No processo de fertilização a interação entre o espermatozóide e o oócito leva a uma série de transformações morfológicas e bioquímicas conhecidas por ativação oocitária, e o mecanismo chave é um sinal de cálcio (GABRIEC et al., 2007). Vários minutos após a entrada do espermatozóide no oócito uma rápida e transitória movimentação de cálcio ocorre da sua reserva intracelular. Esse cálcio é coletado do retículo endoplasmático, mas o cálcio extra-celular também pode ser utilizado para suplementar a reserva, e portanto possibilitar a continuação do sinal de cálcio (TOSTI et al., 2002). A ativação leva à continuação da meiose e extrusão do segundo corpúsculo polar. Na fertilização *in vitro*, os pronúcleos são formados, a síntese de ácido desoxirribonucléico (DNA) se inicia e a clivagem do embrião é iniciada por ativação artificial causada por estímulos externos, e os estímulos podem ser físicos, mecânicos ou químicos (DU et al., 2002).

No entanto, é relevante salientar a possibilidade de formação de partenotos que são o resultado da produção de embrião com ou sem eventual desenvolvimento de um indivíduo, a partir de um gameta feminino na ausência da contribuição do gameta masculino (BEATTY et al., 1957).

Para o sucesso da PIV é fundamental a utilização de meios de cultivo adequados para que ocorra a clivagem, uma vez que os embriões apresentam respostas específicas a diferentes carboidratos, a estágio de desenvolvimento e também a aminoácidos essenciais presentes no meio. Sendo assim, ainda são necessárias pesquisas que permitam definir todos os componentes essenciais aos meios de cultivo, de forma a maximizar a qualidade e produção de embriões (HERRICK et al., 2007).

Devemos lembrar que a criopreservação representa um fator importante no sucesso da FIV com milhões de nascimentos tanto na medicina humana como na medicina veterinária (GOSDEN, 2011; GIANAROLI et al., 2012).

A liofilização, criosecação ou criodesidratação (“freeze-drying”) é um método que visa a preservação celular através do processo de congelamento de uma substância seguida pela redução de um dos solventes, geralmente a água, por sublimação e dessorção para níveis nos quais não é possível nenhuma reação química ou biológica. Para que isso ocorra, a temperatura e a pressão parcial de vapor d’água devem ser inferiores às do ponto triplo, ou seja, 273,16 kelvin (0,01 °C) e a pressão de 611,73 pascal (cerca de 0,006 bar). Se nessas condições um calor latente de 2,84 MJ/kg for fornecido, o gelo transforma-se diretamente em vapor (SHAHAM, 2005).

Uma vantagem do sêmen liofilizado é o fato dele poder ser armazenado a 4°C e ser transportado e armazenado à temperatura ambiente, sem utilizar nitrogênio líquido ou gelo seco como agente resfriador (WAKAYAMA e YANAGIMACHI, 1998; WARD et al., 2003; KANEKO e NAKAGATA, 2005).

Apesar de a liofilização causar lise de membrana e cauda nos espermatozoides, o processo parece não causar danos ao material genético (WAKAYAMA e YANAGIMACHI, 1998).

Nenhum decréscimo na habilidade de gerar embriões à partir de sêmen liofilizado, mantido à 4°C por um período de até 5 anos, foi evidenciado por Kaneko e Serikawa (2012). Nesse caso uma solução contendo 10mM Tris e 1mM EGTA (ácido etileno glicol tetracético) (Applied Biosystems/Ambion, Austin, TX, USA) ajustado para o pH 8.0 foi utilizado para a liofilização de sêmen de camundongo e rato (KANEKO et al., 2007). A análise da fragmentação de DNA e a fertilidade do sêmen puderam demonstrar a tolerância à liofilização e a qualidade do sêmen armazenado à 4°C (KANEKO e SERIKAWA, 2012).

O sêmen liofilizado pode ser mantido por até 3 meses em temperatura ambiente (24°C) com sua fertilidade preservada (KANEKO e NAKAGATA, 2005). No entanto, é importante observar o pH do meio de conservação: se o pH for baixo, ou se um agente quelante não foi utilizado durante o processo de liofilização, ocorrerá a fragmentação da cromatina. Para proteger o DNA espermático da atividade de nuclease endógena durante o armazenamento é importante usar uma pequena quantidade de EDTA (ácido etileno diamino tetracético) e um pH=8.0 (KANEKO e NAKAGATA, 2005).

Para averiguar a qualidade do sêmen liofilizado, vários métodos para avaliação de integridade de DNA são descritos: Halomax (Halotech DNA SL, Madrid, Spain)(KANEKO e SERIKAWA, 2012), laranja de acridina associado à citometria de fluxo (PRINOSILOVA et al., 2012) e o ensaio do Cometa (KAWASE e SUZUKI, 2011).

Kaneko e Serikawa (2012) demonstraram ser possível a produção de filhotes viáveis de camundongo utilizando a combinação das técnicas de liofilização de sêmen e ICSI com índices de sucesso (11%) semelhantes aos dos resultados usando sêmen descongelado ou mesmo a fresco, portanto, há indícios que isso também possa ocorrer com sêmen liofilizado de gato.

Objetivo

3) Objetivo

3.1 Objetivo geral:

Produzir embriões de gatos domésticos (*Felis silvestris catus*) *in vitro* utilizando sêmen liofilizado por meio da técnica de ICSI.

3.2 Objetivos específicos:

- A) Observar a taxa de expansão das células do cúmulus em oócitos de gatas domésticas.
- B) Realizar a avaliação comparativa da fragmentação de DNA do sêmen liofilizado, congelado e fresco de gato doméstico.
- C) Avaliar a taxa de clivagem e formação de blastocisto.
- D) Avaliar a possibilidade de produção de embriões *in vitro* de gato doméstico utilizando sêmen liofilizado.

Material e Métodos

4) Material e Métodos

4.1 Local

O experimento foi realizado no Laboratório de Reprodução de Pequenos Animais e Silvestres (REPAS), e no Centro de Biotecnologia e Diagnóstico em Reprodução Animal (CERAN), ambos pertencentes ao Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária (DRARV) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ). Além de ter sido realizadas algumas etapas no Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu (IBB). Todos os laboratórios pertencem à UNESP, Campus de Botucatu, Botucatu, SP, Brasil.

4.2 Comitê de Ética

Esse projeto está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal e foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, Botucatu, SP, Brasil, protocolo nº 148/2010-CEUA.

4.3 Animais

Foram utilizados 3 (três) gatos adultos, com idade variando entre 2 e 6 anos, como doadores de sêmen; duas gatas adultas castradas foram utilizadas como manequim para auxiliar na colheita de sêmen com vagina artificial. Os animais foram alimentados com ração seca e água *ad libitum*.

11 (onze) gatas com idade superior a um ano foram submetidas à jejum alimentar de doze horas e jejum hídrico de duas horas para a realização de ovariosalpingohisterectomia (OSH) eletiva para obtenção de ovários entre os meses de Agosto e Novembro.

4.4 Colheita e manipulação do sêmen

As amostras de sêmen dos gatos foram colhidas utilizando-se uma vagina artificial, a qual foi confeccionada a partir de tetinas de borracha cortadas e adaptadas a tubos plásticos tipo Eppendorf® de 1,5 mL (SOJKA et al., 1970). As vaginas artificiais foram mantidas à 38°C até o momento da colheita (VILLAYERDE, 2007). Para a colheita de sêmen, foram utilizadas como manequim duas gatas adultas castradas. Estimulada a cobertura, a vagina artificial era posicionada de forma a se encaixar no pênis. Cada gato foi submetido a duas colheitas de sêmen consecutivas, com intervalos de 5 a 10 minutos. As colheitas foram realizadas com intervalos de no mínimo dois dias e foram realizadas as seguintes análises funcionais: concentração espermática e movimento espermático.

4.4.1 Concentração espermática

Foi determinada pela contagem das células espermáticas em câmara hematómica de Neubauer. Dois (2) µL de sêmen foram adicionados a 98 µL de água destilada (diluição 1:50). Uma alíquota de 10 µL foi depositada em cada lado da câmara. Utilizando microscópio de luz com contraste de fase e aumento de 40x, realizou-se a contagem do número de espermatozoides em cinco quadrantes de cada lado da câmara. O cálculo da concentração espermática foi realizado através da fórmula expressa abaixo.

$$C = N \times 2,5 \times 10^6$$

C = concentração de espermatozoides por mL

N = média do número total de células espermáticas contadas em cada lado da câmara de Neubauer.

4.4.2 Avaliação computadorizada da cinética espermática

O sêmen foi avaliado utilizando o sistema HTR-IVOS-12 (Hamilton Thorn Research – Animal Version 12,0 L, Beverly, MA, EUA) previamente ajustado para o sêmen de gato (VILLAYERDE et al., 2009) (**Anexo 1**). Para esta avaliação, uma gota de sêmen foi colocada em câmara de Makler (HTMA) aquecida e analisada à temperatura de 38°C. Para cada amostra de sêmen, três gotas foram avaliadas e a

média dos três melhores campos foi anotada. Durante esta avaliação foram levados em consideração os seguintes parâmetros da cinética de movimento:

MT (%) - motilidade total

MP (%) - motilidade progressiva

VAP ($\mu\text{m/s}$) - velocidade espermática ao longo de uma trajetória média

VSL ($\mu\text{m/s}$) - velocidade espermática ao longo de uma linha reta

RAP (%) – rápidos, apresentando VAP > 70 $\mu\text{m/s}$

4.5 Liofilização do sêmen

Após a colheita, as amostras de sêmen foram centrifugadas a 250xg por 8 minutos, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuspendido em meio SOF (Fluido Sintético de Oviduto ou *Synthetic Oviductal Fluid*) e ajustados numa concentração final de 1×10^3 espermatozóides/mL. Em seguida as amostras foram acondicionadas em criotubos de 2,0 mL com um volume total de 1,0 mL para facilitar o processo de liofilização e a individualização das células espermáticas após a ressuspensão da amostra liofilizada.

As amostras foram levadas ao liofilizador (Edwards do Brasil) onde permaneceram sob a temperatura de -40°C por 72 horas (tempo que o aparelho levou para finalizar o processo de liofilização para amostras de 1mL). Esse tempo foi o suficiente para obter uma amostra estável com 1% de umidade final (pré-determinada pelo liofilizador em questão).

4.6 Laranja de Acridina

O sêmen liofilizado foi ressuspendido em 1 mL de SOF e uma gota foi colocada sobre uma lâmina, e realizado esfregaço. Para o sêmen fresco e o sêmen descongelado foi coletado uma gota de cada um deles e realizado o esfregaço também. O esfregaço foi fixado em Solução Carnoy (etanol-ácido acético 3:1) por 1 minuto, lavado em etanol 70% por 3 minutos e colocado 4mL da solução corante (**Anexo 2**). Passados 5 minutos a lâmina foi lavada em água destilada e aguardou-

se total secagem da lâmina (NAVES et al., 2004). Essa técnica foi utilizada por ser mais rápida e prática apesar de ter menor acurácia se comparada com as demais técnicas a serem descritas (MAGALHÃES, 2010).

O esfregaço foi analisado em microscópio de epifluorescência (NIKON – Episcopic Fluorescence Attchment “EFA” HalogenLamp Set) contando 100 células utilizando objetiva de 100x, sendo que as células consideradas normais (cromatina íntegra) foram aquelas que emitiram fluorescência verde. Já as células que emitiram fluorescência vermelha, laranja e/ou amarela distribuídas no interior da cabeça do espermatozóide foram consideradas anormais com desnaturação total ou parcial da cromatina.

4.7 Ensaio do cometa alcalino

O Teste do Cometa foi realizado para verificar a ocorrência de dano ao DNA, mas também para validar e/ou parear o resultado com aquele obtido pelo teste de Laranja de Acridina (LA). Foi empregada a metodologia descrita por Singh et al. (1988) com modificações. Todas as etapas foram realizadas ao abrigo da luz e sob condições alcalinas.

Os espermatozóides liofilizados foram ressuspensos em meio SOF, o sêmen fresco foi utilizado *in natura*, e o sêmen congelado foi descongelado segundo Villaverde et al. (2009). Após homogeneização, 5µl dessas amostras foram misturados a 100µl de agarose de baixo ponto de fusão 0,5% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e distribuídos sobre lâminas de microscopia pré-revestidas com agarose 1,5% de ponto de fusão normal (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), cobrindo-as com uma lamínula de 24x60mm.

Depois de 5 minutos a 4⁰C ocorreu a solidificação da agarose, e removeu-se as lamínulas. As lâminas foram imersas em solução de lise [2,5 M NaCl (Merck, Darmstadt, Germany), 100 mM EDTA (Merck, Darmstadt, Germany), 10 mM Tris (Amresco, Sólón, Ohio), 1% N-Lauroyl Sarcosine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), pH 10,0; adicionada de 1% de Triton X – 100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 10% de DMSO (Merck, Darmstadt, Germany), e Proteinase K (Merck, Darmstadt, Germany)] , a 4⁰C por 24 horas, para que se destituíssem os componentes de membrana das células.

Após a lise, as lâminas foram lavadas por 5 minutos com PBS livre de Ca^{2+} e Mg^{2+} (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), e levadas para cuba de eletroforese, imersas em solução eletroforética [400 mM NaOH (Merck, Darmstadt, Germany) e 1 mM EDTA (Merck, Darmstadt, Germany), pH 10,0] e deixadas em repouso por 30 minutos para desnaturação do DNA. A fonte de eletroforese foi ajustada para voltagem 25V, 300mA e tempo de corrida de 30 minutos. Iniciada a corrida a miliamperagem foi rigorosamente controlada adicionando ou removendo o tampão de eletroforese da cuba.

As lâminas foram neutralizadas com solução 0,4M Tris (Amresco, Sólón, Ohio), pH 7,5 por 15 minutos, imersas em etanol 95% (Merck, Darmstadt, Germany) para fixação em uma cuba de vidro.

Quando secas as lâminas foram armazenadas em caixas plásticas e mantidas sobre refrigeração à 4°C. As amostras foram coradas com 50 µL de brometo de etídio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluído (20µg/mL) e a análise foi feita em microscópio de fluorescência (Axioplan II-Zeiss, Wolfville, N.S., Canadá) a um aumento de 400x em analisador de imagens (Comet Assay II – Perceptive Instruments, Suffolk, Inglaterra).

Para cada grupo, as amostras foram avaliadas em duplicata e contadas 50 células, utilizando os parâmetros de *tail intensity* (intensidade do DNA contido na cauda do cometa).

Para avaliar a corrida eletroforética foram realizados controles positivos para cada cuba com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 100µM a 4°C, para indução de dano ao DNA. O material controle era sangue de cão sadio, colhido com anticoagulante, acondicionado em gelo e ao abrigo da luz. Os controles foram processados e lidos da mesma maneira descrita para as células espermáticas.

4.8 Teste de avaliação da integridade da cromatina espermática realizada por citometria de fluxo

As análise de citometria de fluxo foram realizadas no equipamento BD LSRFortessa (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) equipado com lasers:

azul 488-nm, 100mW, vermelho 640-nm, 40mW e violeta 405-nm, 100mW. Após a análise, os dados foram arquivados para posterior avaliação através do software FACSDivatm software V6,2 e WinList 6.0 (Verify software house).

4.8.1 Avaliação da suscetibilidade à fragmentação de DNA utilizando Laranja de Acridina na citometria de fluxo:

Uma amostra de 100µL de sêmen liofilizado foi diluída, em solução tampão (0,186g de EDTA dissódico, 0,790g de Tris-HCl, 4,380g NaCl em 500mL água deionizada, pH 7.4) na concentração de 1×10^6 espermatozoides/mL. Foi adicionado 400µL de solução detergente ácida (2,19g NaCl, HCl 1,0mL de 2N solução, 0,25mL Triton-X, em qsp. 250mL de água deionizada, pH1,8). A mesma foi incubada por 30 segundos e então acrescido 1mL de solução corante de laranja de acridina (AO; 3,8869g de ácido cítrico mono-hidratado, 8,9429g Na_2HPO_4 , 4,3850g NaCl, 0,1700g de EDTA dissódico, 4µg/mL de solução laranja de acridina – 1 mg/mL, em qsp. 500mL de água, pH6,0), a qual foi incubada por mais 30 segundo ao abrigo da luz. O índice de fragmentação de DNA (IDF) foi gerado a partir da análise de 10.000 células marcadas com laranja de acridina. Os dados gerados foram analisados pelo software WinList 6.0 (Verify software house). O IDF é a proporção expressa em porcentagem do DNA do espermatozoide, do DNA fragmentado (fluorescência vermelha) dividida pela fluorescência total, ou seja, a soma do DNA fragmentado (fluorescência vermelha) com o DNA não fragmentado (fluorescência verde). O mesmo procedimento foi realizado para o sêmen fresco e para o sêmen descongelado.

4.8.2 TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)- mediated dUTP nick end labeling):

Um total de 200µL de sêmen ($1-2 \times 10^6$ cels/ml) (liofilizado, descongelado e fresco) foi adicionado a 200µL de paraformaldeído a 4% em PBS, em um pH7,4 e incubado por 1 hora em temperatura ambiente. Os espermatozoides foram centrifugados a 300xg por 5 minutos e lavados duas vezes em 200µL de PBS. Os espermatozóides fixados foram então permeabilizados com 0,1 % triton X-100 em 0,1% citrato de sódio (100µL) e colocados em gelo por 2 minutos. Após duas

lavagens as células foram novamente incubadas por 1 hora à 37°C com mistura de reação para TUNEL (50µL) que continha a reação de marcação (AlexaFlour488) e enzima desoxinucleotidil transferase terminal (TdT) no escuro. A mistura para reação de TUNEL (APO-BrdUTM TUNEL Assay Kit - A23210, Molecular Probes) foi preparada imediatamente e mantida em gelo até o uso. Finalmente, as amostras foram lavadas duas vezes, resuspendidas em 500µL PBS e analisadas por citometria de fluxo.

4.9 Obtenção e transporte de ovários

Um total de 11 (onze) gatas adultas foram submetidas à OSH eletiva. Os ovários foram transportados ao Laboratório Reprodução Avançada e Terapia Celular (LANÇA) em tubos de polipropileno do tipo FALCON para centrifugação graduado com fundo cônico (Techno Plastic Product®, Suíça) em 10mL de *Dulbecco's phosphate buffered saline* (DPBS, Nutricell®, Brasil) a 4°C, suplementado com 100mg/mL de estreptomicina e 100UI/mL de penicilina (GIBCO, 15140-122) (JOHNSTON *et al.*, 1989). Os materiais foram identificados com os números dos respectivos animais castrados para posterior comparação de número total de oócitos obtidos por indivíduo, e foram processados dentro de no máximo 3 horas após a remoção (figura 1).



FIGURA 1. Ovários de gata submetida à OSH eletiva e transportados em tubo de centrifugação para o laboratório. Botucatu, 2013.

4.10 Recuperação e seleção de oócitos

Os ovários foram isolados, dissecados e liberados de tecido adiposo e vasos adjacentes. A recuperação dos CCOs foi realizada em placas de Petri de plástico, com dimensões de 60x15mm (Ingámed®, Brasil), contendo 8mL de DPBS suplementado com 100mg/mL de estreptomicina e 100UI/mL de penicilina (GIBCO, 15140-122) aquecidos a 38°C. Cada ovário foi submetido à técnica de *slicing* (fatiamento), utilizando-se uma lamina de bisturi e pinça anatômica pequena (**Figura 2**).

Nessa mesma placa, sob lupa estereomicroscópica (MZ 125, Leica®, Alemanha) procedeu-se a classificação dos CCOs (**Figura 3**). Foram utilizados apenas CCOs que apresentavam citoplasma uniforme e fortemente pigmentado, envoltos por duas ou mais camadas de células da granulosa firmemente aderidas (CCOs de grau I) (JOHNSTON et al., 1989; FREISTEDT et al., 2001; MURAKAMI et al., 2002)(**Figuras 4 e 5**).



FIGURA 2. Técnica de *slicing* (fatiamento) para a recuperação de oócitos de gata.



FIGURA 3. Graus variados de CCOs de gata.



FIGURA 4. CCOs de grau I de gata. (Microscópio de luz, aumento 400x)

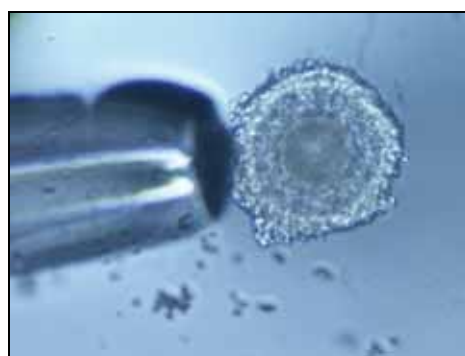


FIGURA 5. CCO de grau I de gata. (Microscópio de luz, aumento 400x)

4.11 Maturação *in vitro* de oócitos

Os CCOs de grau I foram agrupados em grupos de 10 e foram lavados por cinco vezes em gotas de MEM-hepes (Gibco, 12360-038) acrescido de 4mg/mL de BSA (Sigma A4503), 1mM de piruvato de sódio (Sigma, P2256), 0,13mM de cisteína (Sigma, C1276), 100mg/mL de estreptomicina e 100UI/mL de penicilina. Foram obtidos, em média, 19 CCOs de grau I por gata castrada. Em seguida, os CCOs foram lavados em cinco gotas de meio SOF (Fluido Sintético de Oviduto) acrescido de 100mg/mL de estreptomicina e 100UI/mL de penicilina.

A maturação oocitária *in vitro* foi realizada em placas do tipo *four-well* (Nunc®, Dinamarca). Em cada poço foram colocados 400µL de meio SOF e 20 CCOs de grau I e o período de maturação foi de 30 horas em atmosfera úmida de 5%O₂, 5%CO₂ e 90% N₂ (**Figura 6**).



FIGURA 6. Placa do tipo *four-well* com 400µL de meio MIV para maturação de oócitos de gata.

4.12 Fertilização *in vitro*

Ao final do período de maturação os oócitos apresentaram expansão das células do *cumulus* (**Figura 7**) e foram distribuídos aleatoriamente em grupos para fertilização *in vitro* da seguinte maneira:

Grupo I: oócitos não fertilizados.

Grupo II: oócitos fertilizados com sêmen fresco

Grupo III: oócitos fertilizados com sêmen descongelado

Grupo IV: oócitos fertilizados com sêmen liofilizado

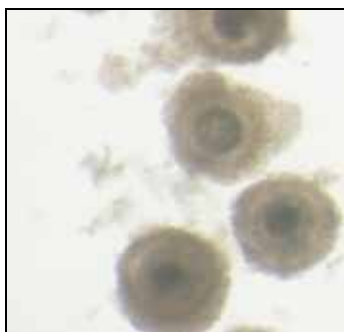


FIGURA 7. CCOs de grau I de gata com expansão de células do *cumulus*.

Os grupos I e II seguiram o seguinte protocolo:

Grupos de 10 oócitos foram transferidos para gotas de 90µL de meio TALP-FIV (**Anexo 3**) suplementado com 20µg/mL de Heparina (Sigma H-3149), 6 mg/mL de BSA, 1mM de piruvato, 100mg/mL de estreptomicina e 100 UI/mL de penicilina e cobertas por óleo mineral (Sigma, M8410).

O grupo I permaneceu por 20 horas no meio TALP-FIV para verificação de possível clivagem.

No grupo II o sêmen foi diluído na proporção 1:4 em meio TALP-sêmen (**Anexo 4**) adicionado de 6mg/mL de BSA, 1mM de piruvato, 100mg/mL de estreptomicina e 100UI/mL de penicilina e centrifugado a 250xg durante 8 minutos. Após, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* diluído em 30µL de meio TALP-FIV. A motilidade espermática foi avaliada. A concentração foi determinada em câmara de Neubauer após a diluição do sêmen em água destilada (1:50), conforme descrito anteriormente.

O volume de meio TALP-FIV que foi adicionado ao sedimento (pellet + 30µL TALP-FIV) para que se obtivesse uma concentração final de 1×10^7 espermatozoides/mL foi calculado utilizando a fórmula expressa a seguir:

$$V_{\text{tot}} = \text{mot} \times v_{\text{sed}} \times 0,5 \times n$$

V_{tot} = volume total

mot = motilidade

v_{sed} = volume do sedimento

n = número de espermatozóides contados na câmara de Neubauer
0,5 = fator de correção.

(resultado = 100.000 espermatozóides móveis/10 µL volume total)

Posteriormente, 10µL de sêmen diluído foram adicionados às gotas contendo 10 oócitos, obtendo-se uma concentração final de 1×10^5 espermatozóides móveis/gota e prosseguiram por 18 horas de co-cultivo à temperatura de 38°C e atmosfera úmida de 5%CO₂ em ar.

Para os grupos III e IV foram preparadas placas de Petri com dimensões de 60x15mm onde foram colocadas 12 gotas de 8µL (**Figura 8**) de SOFaa (**Anexo 5**) cobertas por óleo mineral. Em cada gota foi colocado um único oócito selecionado dentre um grupo de 10 oócitos previamente maturados *in vitro*, após terem sido denudados por meio da passagem pelo lúmen estreito de pipeta de vidro. Duas gotas de 50µL foram utilizadas para a limpeza da micropipeta de injeção.

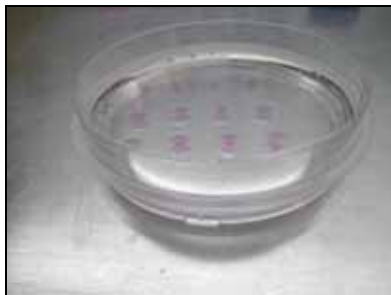


FIGURA 8. Placa de petri com gotas de meio SOFaa cobertas com óleo mineral.

No grupo III, foi utilizado sêmen descongelado (meio Tris e gema de ovo, suplementado com 4% de glicerol). O sêmen foi descongelado a 46°C por 12 segundos (VILLAYERDE, 2007) e os espermatozóides foram selecionados pelo método de gradiente Percoll (Nutricell®) e novamente centrifugado a 250xg durante 8 minutos com SOFaa para lavagem dos resíduos de Percoll e foi resuspenso em meio SOFaa a uma concentração final de 1×10^5 . Logo em seguida uma gota de 6µL de sêmen foi utilizada para selecionar um único espermatozóide que foi aspirado pela cauda utilizando a micropipeta de injeção do micromanipulador (**Figuras 9 e**

10). Este espermatozóide foi injetado no oolema conforme descreveremos a seguir (item 4.13). Foi utilizado o micromanipulador com as seguintes configurações:

- a) microscópio invertido ECLIPSE TS-100 (Nikon)
- b) “joystick” transferMan NK2 (Eppendorf)
- c) cellTram oil (Eppendorf)



FIGURA 9. Micromanipulador para realizar o procedimento de ICSI.

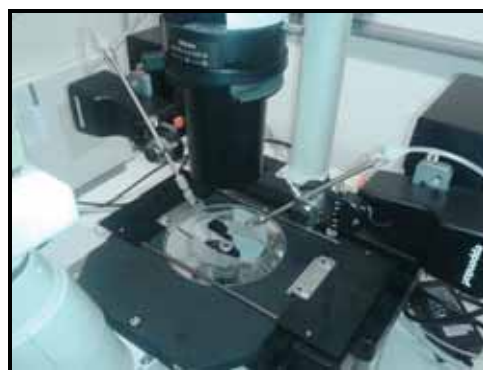


FIGURA 10. Micropipetas de retenção e injeção.

No grupo IV foi utilizado o sêmen liofilizado em meio SOF. O sêmen foi ressuspendido em 1 mL de meio SOFaa e homogeneizado. Uma gota de 6 μ L do sêmen resuspendido foi utilizada para selecionar um único espermatozóide para ser injetado dentro do oolema. Para a seleção do espermatozóide foi preciso afastar os resíduos de sais do meio SOF liofilizado.

4.13 Injeção intracitoplasmática de espermatozóide

Para a injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI) realizada nos grupos III e IV, foi utilizado uma placa de Petri de plástico contendo gotas de 8 μ L de meio SOFaa cobertas por óleo mineral. Em cada uma dessas gotas foi depositado um oócito maturado in vitro. Para cada procedimento foi utilizado uma micropipeta de injeção com bixel e diâmetro interno de 6 μ m para a aspiração e injeção do

espermatozóide, e uma micropipeta de retenção (holding) de diâmetro interno de 20µm para manter o oócito na posição desejada durante o procedimento.

Duas gotas de 50µL de meio SOFaa foi utilizada para limpar a micropipeta de injeção após cada procedimento de forma a evitar o contato de óleo mineral com ambos o espermatozóide e o oócito.

A micropipeta de injeção não possuía inclinação e portanto o braço direito do micromanipulador foi ajustado para uma inclinação de cerca de 35° de modo a facilitar o procedimento de injeção de espermatozóide.

A micropipeta de retenção foi mantida em posição estável segurando o oócito para que fosse possível transpassar a zona pelúcida com a micropipeta de injeção e assim depositar o espermatozóide dentro do oolema (**Figura 11**).



FIGURA 11. Momento de injeção de espermatozóide de gato doméstico no oolema.

4.14 Cultivo *in vitro* (CIV) de embriões

Decorridos 18 horas da FIV no grupo II e o “feeding” (reposição de meio) do grupo I os possíveis zigotos/partenotos foram desnudados. Estes prováveis zigotos/partenotos foram lavados em 3 gotas de 90 µL de meio SOF para remoção de espermatozóides e restos celulares e transferidos em grupos de 10 para gotas de 90µL de meio SOFaa acrescido de 6 mg/mL de BSA, 1mM de piruvato, 1mM de glutamina, 2,7mM de mioinositol (Sigma, I5125), 100mg/mL de estreptomicina e 100UI/mL de penicilina.

A taxa de clivagem foi avaliada aproximadamente 72 horas após a fecundação. Somente os embriões clivados foram transferidos para gotas de 50µL

(10 oócitos/gota) do mesmo meio em que estavam sendo cultivados substituindo-se BSA por 5% SFB no início do dia 4 (D4), o meio SOFaa foi também suplementado com 1,5 mM de glicose. Por 4 dias consecutivos de cultivo, os embriões foram incubados a 38°C em atmosfera úmida de 5% O₂, 5% CO₂ e 90% N₂.

No sétimo dia após a fecundação *in vitro* (D7) foi avaliada a taxa de desenvolvimento até o estágio de blastocisto.

No caso dos grupos III e IV, 15 horas após o procedimento de ICSI os oócitos foram examinados para visualização da formação de dois pronúcleos e do segundo corpúsculo polar. Os embriões (de ICSI) foram acompanhados diariamente para verificar a evolução do embrião e o meio das gotas foi trocado a cada 48 horas até o D7.

4.15 Análise estatística

A análise estatística foi realizada no software SAS (SAS Ins. Inc., Cary, NC). Os dados foram analisados quanto à normalidade através do teste de Shapiro-Wilk, quando necessário os dados foram transformados por arcosseno. Foi utilizado o Proc GLM para os dados do ensaio Cometa e as médias foram separadas utilizando o LSD com nível de significância de 5% ($P < 0,05$). Os resultados estão apresentados não transformados em forma de média dos quadrados mínimos +/- erro padrão. Já para os dados de integridade de membrana acrossomal foi utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. Foi utilizado o teste do Qui Quadrado para comparar a proporção de embriões clivados entre grupos de tratamento, observando que a clivagem não foi homogênea ($P < 0,0001$). Para comparar a porcentagem dos embriões formados entre os grupos foi utilizado o teste de Fisher.

Resultados

5) Resultados

Sêmen com resultado acima de 85% de integridade de membrana, motilidade total (MT) acima de 84%, e motilidade progressiva acima de 65% (CASA) determinou os animais que fariam parte do experimento

5.1 Avaliação computadorizada da cinética espermática

Três alíquotas de cada uma das amostras de sêmen fresco utilizadas para a liofilização provindas de cada um dos gatos foram testadas através do CASA para verificar a qualidade do sêmen antes do processo e após descongelação de forma a verificar a qualidade do sêmen após criopreservação convencional. Não houve diferença estatística entre o sêmen fresco e descongelado (Tabela 1).

TABELA 1: Médias ($\pm$ desvio padrão) obtidas para as características espermáticas do sêmen de gato (fresco e descongelado) através do CASA (Computer-Assisted Sperm Analyzer, HTR-IVOS-10, Hamilton Thorne Research – Animal Version 12,0 L, Beverly, MA, EUA). Botucatu, 2013

VARIÁVEL	Sêmen fresco	Sêmen descongelado
	MÉDIA $\pm$ DESVIO	MÉDIA $\pm$ DESVIO
	PADRÃO	PADRÃO
MT	88,1 $\pm$ 1,5	85,4 $\pm$ 1,2
MP	68,2 $\pm$ 2,5	66,1 $\pm$ 1,1
VAP	140,5 $\pm$ 3,0	131,5 $\pm$ 2,5
VSL	122,3 $\pm$ 3,1	109,3 $\pm$ 2,1
RAP	84,1 $\pm$ 2,5	78,2 $\pm$ 2,8

* MT (motilidade total); MP (motilidade progressiva); VAP (velocidade espermática ao longo de uma trajetória média); VSL (velocidade ao longo de uma linha reta); RAP (rápidos).

5.2 Avaliação da fragmentação de DNA realizada por Teste de Laranja de Acridina Convencional, Ensaio do Cometa, e citometria de fluxo

Para cada avaliação foram utilizadas as alíquotas exigidas para satisfazer os protocolos dos respectivos testes utilizando sêmen fresco, descongelado, liofilizado conforme descrito no item 4 (Material e métodos).

TABELA 2: Resultado da avaliação da integridade de DNA de células espermáticas de gato provenientes de sêmen fresco, descongelado e liofilizado utilizando a sonda fluorescente de Laranja de Acridina convencional, ensaio do Cometa, Laranja de Acridina na citometria de fluxo (IDF) e TUNEL. Botucatu, 2013.

Avaliação de lesão de DNA	fresco	descongelado	liofilizado
Laranja de Acridina	1,5±0,8 ^a	6,7±0,8 ^b	24,8±0,8 ^c
Ensaio do cometa	0,34±0,4 ^a	1,84±0,4 ^b	5,21±0,4 ^c
IDF	2,5±0,5 ^a	6,3±0,5 ^b	37,6±0,5 ^c
TUNEL	2,3±1,0 ^a	8,1±1,0 ^b	92,1±1,0 ^c

* Médias seguidas de letras diferentes numa mesma linha diferem entre si ($p \leq 0,05$).

Houve diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) no que diz respeito a integridade de DNA espermático entre as amostras de sêmen fresco, sêmen descongeladas e diluído quando avaliadas através do teste de Laranja de Acridina convencional (utilizando microscopia de epifluorescência) (Tabela 2).

O Ensaio do Cometa confirmou que as células espermáticas de gato submetidas ao processo de liofilização e ressuspendidas em meio SOF, apresentaram um grau de lesão de DNA maior quando comparada com sêmen fresco e descongelado ($p \leq 0,05$) (Tabela 2).

Tanto a avaliação da suscetibilidade à fragmentação de DNA utilizando Laranja de Acridina na citometria de fluxo, quanto o TUNEL mostraram que o sêmen liofilizado possui um grau superior de lesão de DNA quando comparado com o sêmen fresco e descongelado ($p \leq 0,05$) (Tabela 2).

5.3 Maturação oocitária *in vitro*

TABELA 3: Média e desvio padrão do número de Complexo *Cumulus Oophorus* (CCOs) de grau I antes e após expansão das células do cúmulus.

número de gatas	CCO II/animal	CCO I (cúmulus expandido)
11	19,2±4,0 ^a	18,2±4,0 ^a

* Médias seguidas de letras diferentes numa mesma linha diferem entre si ($P \leq 0,05$).

A taxa de expansão de células do *cumulus* foi da ordem de 94,3% provando que o meio de maturação foi eficiente e adequado. Somente os CCOs que apresentaram expansão das células do *cumulus* foram utilizados para a fertilização. Não houve diferença estatística entre o número de CCOs I selecionados e o número de CCOs I resgatados com expansão das células do *cumulus* (Tabela 3).

5.4 Produção de embriões *in vitro*

TABELA 4: Produção de blastocistos utilizando sêmen fresco, descongelado e liofilizado apresentados em porcentagem (%). Grupo controle não utilizou sêmen. Botucatu, 2013.

Grupo	Controle	fresco	descongelado	liofilizado
Formação blastocisto	0,0 ^a	88,0 ^b	80,0 ^b	6,0 ^c

* Para o sêmen descongelado e liofilizado foi utilizado a técnica de ICSI para fertilização.

** Médias seguidas de letras diferentes numa mesma linha diferem entre si ($P \leq 0,05$).

*** Para cada grupo foram utilizados 50 oócitos.

As fertilizações *in vitro* (FIV) utilizando sêmen fresco e sêmen descongelado resultaram na produção de blastocistos (Taxa de formação de blastocisto da ordem de 88% e 80%, respectivamente) (Tabela 4).

Discussão

6) Discussão

A inseminação artificial (IA) é uma técnica amplamente utilizada para superar certas barreiras biológicas visando a reprodução de diversas espécies, e a FIV também pode auxiliar nesse processo, e é nesse contexto que a utilização de sêmen liofilizado pode trazer grandes benefícios para a conservação de espécies (WAKAYAMA e YANAGIMACHI, 1998; MARTINS, 2006). O uso de sêmen liofilizado pode contribuir para a formação de bancos genéticos, mas também para simplificar a produção de animais geneticamente modificados, e isso sugere que no futuro não será mais necessário o uso de nitrogênio líquido para preservar célula espermática (KANEKO, 2012), desde que o DNA se mantenha íntegro após o processo de liofilização.

Em nosso experimento vimos que para obter espermatozóides com DNA íntegro há necessidade da adição de algum crioprotetor para que as células resistam ao processo de liofilização, como demonstrado por Czarny *et al.* (2009), e que o simples fato das células espermáticas ficarem firmemente aderidas durante a liofilização (MAGALHÃES, 2010) não é suficiente para preservar a cromatina espermática.

Em trabalho anterior vimos a possibilidade de utilizar um meio quimicamente definido e de uso prático para liofilização de sêmen de gato doméstico de forma a poder viabilizar essa técnica de preservação para felídeos selvagens. No entanto, as células espermáticas de gato doméstico que foram liofilizadas com meio SOF mostraram-se completamente imóveis após sua ressuspensão (MAGALHÃES, 2010) e, portanto, precisaram do auxílio da técnica de ICSI para sua utilização na FIV.

Apesar da facilidade de se trabalhar com o meio SOF, esse meio não conferiu proteção suficiente para o DNA espermático durante o processo de liofilização conforme demonstrado na Tabela 2. Nosso intuito foi avaliar a possibilidade de utilizar um meio prático para se trabalhar com liofilização de células espermáticas de animais selvagens.

O sêmen utilizado no processo de liofilização deste trabalho foi o mesmo utilizado no processo de congelamento/descongelamento e de acordo com os resultados obtidos podemos afirmar que o meio SOF não fornece proteção suficiente para o

DNA espermático durante a liofilização. O sêmen congelado/descongelado com crioprotetor apresentou níveis menores de fragmentação de DNA. Uma solução para evitar a fragmentação do DNA da célula espermática durante o processo de liofilização seria o uso de um meio contendo ácido etileno glicol tetracético (EGTA) e solução tampão Tris-HCl (ETBS) como já utilizado em outras espécies (KANEKO et al., 2003; WARD et al., 2003; KUSAKABE et al., 2008). Além disso, há relatos que o ETBS assegura estabilidade genômica por duas gerações subseqüentes (LI et al., 2009). Possivelmente esses meios teriam protegido o DNA espermático do sêmen de gato, mas não seria prático para ser utilizado com animais silvestres a campo, como tínhamos em mente na escolha do meio SOF. Ainda não há trabalho publicado com liofilização de sêmen de gato utilizando tais meios e portanto esse será o próximo caminho para nosso estudo.

Para que as amostras de sêmen liofilizado permaneçam estáveis é necessário o controle da umidade presente no momento final da liofilização (KAWASE et al., 2005). Como nossas amostras continham 1% de umidade final total pré-determinada pelo liofilizador utilizado, optou-se por mantê-las a 4°C onde então evitaríamos atividade biológica.

Estudos têm demonstrado que a organização anormal da cromatina espermática é frequente em machos subfêrteis e infêrteis (DONNELLY et al., 2001), e alterações na organização do material genômico do espermatozóide podem ter um sério impacto na fertilidade, pois, ainda que com seu material genético fragmentado, o espermatozóide pode fecundar o ócito podendo causar problemas na prole ou mesmo em gerações futuras (HAINES, 2001).

Janny e Menezo (1994) reportaram que o desenvolvimento embrionário até o estadio de blastocisto está relacionado com a qualidade espermática e relataram que um aumento na fragmentação de DNA reduz significativamente o desenvolvimento embrionário até o estadio de blastocisto, e uma fragmentação da ordem de 92,1% (Tabela 2) justificaria então a ausência de formação de blastocistos com o sêmen liofilizado.

Dentre os testes utilizados para avaliação da fragmentação do DNA da célula espermática, alguns testes são os mais escolhidos pela comunidade científica: o TUNEL (Terminal Uridine Nick End Labelling) , o SCSA (Sperm

Chromatin Structure Assay), o SCGE (Single-Cell Gel Eletrophoresis), o Ensaio Cometa (EVENSON e WIXON, 2006), e o Laranja de Acridina (LA)(NAVES *et al.*, 2004), e isso justifica a escolha dos testes utilizados em nosso experimento.

Várias condições relacionadas com o processo de liofilização precisam ser melhor investigadas como por exemplo as soluções destinadas à liofilização, e a pressão de secagem primária na câmara de liofilização. Além disso a análise de cromossomos após a realização da ICSI também precisa ser melhor estudada, para assegurar que o processo de ICSI tenha sucesso (KAWASE e SUZUKI, 2011).

É essencial que se avalie o nível de fragmentação de DNA do sêmen liofilizado antes de seu uso. A análise da cromatina espermática fornece informações sobre a capacidade fertilizante do sêmen (KAWASE e SUZUKI, 2011); é uma variável independente da qualidade do sêmen, além disso, para a produção de embriões in vitro, utilizando sêmen liofilizado, há necessidade de se avaliar a perda da viabilidade da célula espermática após sua rehidratação (GOSDEN, 2011), pois conforme vimos na Tabela 2 o processo de liofilização causa grande alteração na integridade da cromatina espermática..

Nesse estudo optou-se inicialmente pelo teste mais simples, rápido e menos oneroso mas confiável e efetivo, por isso utilizamos o LA. No entanto, verificou-se que apesar do LA identificar as amostras com maior grau de lesão de DNA, não consegue quantificar com precisão o grau de fragmentação de DNA. Nesse estudo o teste que mostrou maior acurácia no que diz respeito a perda de integridade de DNA espermático foi o TUNEL (Tabela 2). Kawase *et al.* (2009), também observou uma detecção mais apurada do TUNEL em relação ao Ensaio do Cometa Alcalino para avaliação da cromatina espermática.

O Ensaio do Cometa também foi utilizado nessa avaliação e é uma técnica utilizada como padrão ouro para detecção de fragmentação de DNA. No entanto, deve-se recorrer ao Ensaio do Cometa Alcalino ao invés do Ensaio do Cometa Neutro, pois o primeiro pode detectar sítios alcali-lábeis, quebras de fita única de DNA e quebras de fita dupla, e o segundo geralmente revela apenas quebras de fita dupla de DNA (BAUMGARTNER, 2009), mesmo assim verificamos maior sensibilidade do TUNEL em relação a este teste conforme demonstrado na Tabela 2.

Sendo assim, a produção *in vitro* de embriões utilizando amostras de sêmen liofilizado de gato doméstico foi considerado um teste final da viabilidade do uso do meio SOF para liofilização de células espermáticas. Assim como Liu et al. (2004), nossas amostras apresentaram células espermáticas completamente imóveis, após serem ressuspensas, necessitando portanto de técnicas especiais (ICSI) para realizar o processo de fertilização.

Há indícios de que um núcleo espermático intacto é a única condição necessária para o desenvolvimento embrionário, mesmo quando a motilidade e integridade de membrana dos espermatozoides estão comprometidas (KUSAKABE et al., 2001). Também há relatos de que apesar de imóveis os espermatozoides liofilizados e ressuspensos tem grande resistência à fatores ambientais e irradiação gama (KUSAKABE et al., 2004), portanto mesmo imóveis resistem à certos estresses ambientais, o fato deles estarem intimamente ligados uns aos outros após o processo de liofilização conforme demonstrado por Magalhães (2010) através da microscopia eletrônica de varredura também pode contribuir na proteção da cromatina das células espermáticas.

Sabe-se que mesmo utilizando um espermatozoide com DNA fragmentado, a fertilização pode ocorrer, pois existe uma troca de cromátides que segue um padrão espécie-específico (oócito-específico) dependendo do sistema de reparo nos oócitos fertilizados com espermatozoide (TATENO et al., 1996). No entanto, tal reparo pode levar à incidência de aberrações cromossômicas (KAMIGUCHI et al., 1995) e isso pode ter contribuído com a grande redução de formação de blastocistos demonstrado na Tabela 4.

Em experimento anterior Magalhães, (2010) submeteu o sêmen a congelamento antes das amostras serem liofilizadas, o que resultou num período de 48 horas para a liofilização das amostras. No entanto, após a ressuspensão das amostras, as membranas espermáticas foram rompidas e a cromatina espermática apesar de ainda condensada, se encontrava livre no meio diluidor. Já no experimento atual optou-se por não congelar previamente as amostras e conduzi-las diretamente ao liofilizador, o que resultou em um tempo maior de liofilização (3 dias), mas as membranas celulares foram conservadas e foi possível a realização da ICSI.

A utilização de sêmen fresco para a realização da FIV e a obtenção de uma taxa de formação de blastocisto da ordem de 88% nos assegurou sobre a qualidade do sêmen. A ICSI com o uso de sêmen descongelado apresentou um índice de 80%, porcentagem semelhante ao obtido por outros autores (KARJA et al., 2002; NAGANO et al., 2008).

Van Steirtegehn et al. (1993) relatou que as taxas de fertilização após ICSI foram semelhantes aquelas na FIV, demonstrando que a primeira técnica é viável para a produção de embriões e portanto pode ser utilizada com segurança para a produção de embriões com sêmen liofilizado.

O meio utilizado para a produção de blastocisto em nosso experimento foi o meio SOFaa, já que Freisted et al. (2001) relataram uma taxa de 30,9% de blastocisto quando utilizaram esse meio. Além disso, esse meio mostrou ser capaz de produzir um número maior de blastocistos se comparado com o TCM 199 (BOGLIOLO et al., 2001).

Observamos que a simples introdução e cultivo dos CCOs em meio SOFaa foi capaz de ativar os oócitos de forma a produzir partenotos, uma vez que os CCOs do grupo controle não foram inseminados e mesmo assim apresentaram clivagem (8%). Nagano et al. (2008) obtiveram porcentagem semelhante de partenotos (10%) com o meio TCM199. Isso pode ocorrer devido aos cátions presentes nos meios.

Após microinjeção de espermatozóide no oolema (ICSI) do grupo III, os oócitos foram mantidos em SOFaa e observou-se a formação de blastocistos (40%). Probst e Rath (2003) demonstraram que o CaCl_2 presente no meio é capaz de ativar oócitos *in vitro*, e essa ativação oocitária se faz necessária para que o procedimento de ICSI tenha sucesso. No entanto, a ICSI do grupo IV não foi capaz de produzir blastocisto, o que deve ser resultado de falhas muito mais relacionadas com o espermatozóide do que com o oócito.

Apesar da ICSI com sêmen liofilizado não ter produzido blastocistos, os procedimentos do grupo IV levaram a clivagem de CCOs, o que provavelmente foi resultado de ativação partenogênica uma vez que eles não se desenvolveram até o D7 como os CCOs fertilizados com sêmen descongelado. A combinação de agente químico (meio de cultivo) e agente físico (microinjeção) podem ter colaborado com

nossa taxa de partenogênese (4%), o que também foi demonstrado por Gabrieç et al. (2007).

Para que ocorra o desenvolvimento embrionário é necessário a ativação do oócito, e Hoshi et al. (1994) sugeriram a adição de cálcio ionóforo no meio de cultivo após a ICSI, para auxiliar nesse processo. É provável que alguns CCOs não tenham sido ativados pela simples lavagem em meio SOFaa, conforme relatado por Heindryckx et al. (2005), e nem pela manipulação (microinjeção), o que resultou no insucesso da produção de blastocisto.

A taxa de produção de blastocisto utilizando sêmen descongelado e ICSI (24%) foi significativamente menor ($p < 0,05$) que aquela de blastocistos produzidos utilizando FIV e sêmen fresco (38%) isso também foi demonstrado por Van Steriteghem et al. (1993) e Dumoulin et al. (2000).

O espermatozoide pode ser submetido a liofilização sem perder sua viabilidade após ressuspensão; sua cromatina é altamente condensada, o que protege seu material genético conservando-o para seu papel na fertilização (GOSDEN, 2011). No entanto a necessidade da ICSI juntamente com a liofilização acrescenta fatores prejudiciais que podem levar ao insucesso da produção de embriões. A diferença no tempo de clivagem também pode explicar a falha no desenvolvimento de blastocistos. CCOs que tiveram a primeira clivagem antes de decorridas 27 horas da fertilização conseguiram atingir o estágio de blastocisto. Em contrapartida, os embriões que apresentaram a primeira clivagem entre 27 e 42 horas após a fertilização não atingiram o estágio de blastocisto. Isso foi demonstrado por Klincumhom et al. (2012).

O procedimento de ICSI deve ser realizado no período de tempo o mais curto possível para não expor as células principalmente à diferenças de temperatura e por isso pode ter ocorrido a seleção de espermatozóides com má-formações sutis, uma vez que estes foram selecionados em microscopia convencional (BARTOOV e HEMED, 2003). Essa seleção de espermatozóide pode influenciar negativamente na produção de blastocistos e isso justificaria os resultados obtidos na Tabela 4.

Além disso, há evidências que apenas a avaliação da morfologia dos CCOs antes da MIV e o estágio de maturação dos oócitos após MIV sejam avaliações

inadequados para prever a possibilidade de sucesso em produzir embriões. Dessa forma há necessidade de desenvolver ensaios que avaliem a maturação oocitária completa - nuclear e citoplasmática - e que não sejam invasivos (SPINDLER et al., 2000) para que se garanta um índice mais elevado de produção de blastocistos.

Durante o processo de ICSI o espermatozoide é injetado com acrossoma, membrana acrossomal e membranas espermáticas dentro do oolema o que pode ser prejudicial ao processo de desenvolvimento embrionário, pois podem levar à deformação e lise do oócito (NAKAI et al., 2011). No caso dos espermatozoides liofilizados, com a perda e rompimento das membranas espermáticas devido a liofilização acreditávamos que a descondensação e a fusão dos gametas poderia ser facilitada. No entanto, os ensaios para verificação de fragmentação de DNA mostraram a ocorrência de lises consideráveis no DNA espermático, o que justifica a não formação de blastocistos.

O fato do processo de liofilização causar lesões de membranas espermáticas pode ter favorecido a fragmentação do DNA espermático pois as nucleases endógenas dos espermatozoides são liberadas após as lises dessas membranas e são ativadas por cátions bivalentes como o Mg^{2+} e o Ca^{2+} (SOTOLONGO et al., 2005) que se encontram presentes no meio SOFaa. A suplementação com EGTA, que é um agente quelante de cátions, poderia ter evitado a fragmentação do DNA durante a liofilização e assim melhorado o desenvolvimento embrionário após a ICSI (NAKAI et al., 2007).

No caso dos espermatozoides descongelados, durante o processo de seleção e imobilização (sucção e ejeção) para a realização de ICSI (POPE et al., 1998) podem ter ocorrido rupturas nas membranas espermáticas, facilitando o desenvolvimento embrionário, as rupturas de membrana durante o processo de liofilização no entanto podem ser prejudiciais por favorecer a fragmentação de DNA. Outro fator que pode ter colaborado com o desenvolvimento embrionário foi a pressão exercida sobre a cauda do espermatozoide contra a placa de petri para sua decaptação pois isso permitiu o acesso de fatores descondensadores do oócito ao núcleo espermático (DOZORTSEV et al., 1995).

A lise da membrana plasmática do espermatozoide é um processo importante porque a ativação do oócito também depende do fator espermático

ativador de oócito (SOAF)(SHIRAZI et al., 2009). Além disso, o centrosoma provindo do espermatozoíde parece ser o único centrosoma ativo durante os estágios iniciais da embriogênese (LOUTRADI et al., 2006).

Deve-se lembrar que o próprio procedimento de ICSI pode levar à padrões anormais de lise no oolema durante a penetração da micropipeta de injeção de espermatozoide (PALERMO et al., 1996), e isso pode influenciar nos resultados.

O uso do “piezo-drive” solucionaria duas problemáticas, a de vencer a barreira da zona pelúcida tornando mais rápido o processo de injeção de espermatozoide, e a de garantir a ativação do oócito através dos pulsos piezo-elétricos (LAZZARI et al., 2002; YOSHIDA e PERRY, 2007). Desta forma o fator de ativação oocitária seria descartado das possíveis causas do insucesso na produção de blastocistos.

O emprego de ICSI com sêmen descongelado se faz relevante pelo simples fato que muitas vezes ao descongelar as amostras de sêmen a quantidade de espermatozoides móveis é tão baixa para a FIV, que somente com o emprego da ICSI essas amostras resultariam na formação do zigoto (SZCZYGIEL et al., 2002). Nesse contexto, a utilização de ICSI é de grande valia não somente para assegurar a produção de embriões de gatos não-domésticos, cujo sêmen descongelado apresenta baixa motilidade, mas também com sêmen liofilizado já que os espermatozoides se apresentam imóveis após ressuspensão. Sendo assim, maiores estudos são necessários para confirmar a viabilidade do sêmen liofilizado de gato doméstico para a produção de embriões *in vitro*.

Conclusão

7) Conclusão

1. O sêmen liofilizado chegou a apresentar alto índice de fragmentação de DNA
2. A taxa de expansão de células do *cumulus* em óocitos de gatas domésticas foi satisfatória.
3. A taxa de clivagem para sêmen fresco e descongelado foram semelhantes a de outros autores, assim como a taxa de formação de blastocisto.
4. Não foi possível produzir embriões de gatos domésticos utilizando sêmen liofilizado em meio SOF por meio da técnica de ICSI.

Bibliografia

8) Bibliografia

BARTOV, B.; HEMED, M.; Method for selecting spermatozoon. **United states patent application publication**. US 2003/0039953 A1, p.1-5, 2003.

BAUMGARTNER, A.; CEMELI, E.; ANDERSON, D. The comet assay in male reproductive toxicology. **Cell Biol. Toxicol.** v.25, p.81–98, 2009.

BEATTY, R.A. Parthenogenesis and polyploidy in mammalian development. Cambridge: Cambridge University Press, 1995, p.134.

BETTERIDGE, K.J.; REIGER, D. Embryo transfer and related techniques in domestic animals, and their implications for human medicine. **Hum. Reprod. Update** v.8, p.147–167, 1993.

BOGLIOLO, L.; LEONI, G.; LEDDA, S.; NAITANA, S.; ZEDDA, M.; CARLUCCIO, A.; PAU, S. Intracytoplasmic sperm injection of in vitro matured oocytes of domestic cat with frozen-thawed epididymal spermatozoa. **Theriogenology**. v.56, 955-967, 2001.

COMIZZOLI, P.; WILDT, D.E.; PUKAZHENTHI. *In vitro* compaction of germinal vesicle chromatin is beneficial to survival of vitrified cat oocytes. **Reprod. Dom. Anim.** v.44 (Suppl.2), p.269-274, 2009

CZARNY, N.A.; HARRIS, M.S.; DE IULIIS, G.N.; RODGER, J.C. Acrosomal integrity, viability, and DNA damage of sperm from dasyurid marsupials after freezing or freeze drying, *Theriogenology*. v.72 (6), 817-825, 2009.

DONNELLY, E. T.; STEELE, E. K.; McCLURE, N.; LEWIS, S. E. N. Assessment of DNA integrity and morphology of ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men before and after cryopreservation. *Human Reproduction*, v.16, p.1191-1199, 2001.

DONOGHUE, A.M.; JOHNSTON, L.A.; SEAL, U.S.; ARMSTRONG, D.L.; TILSON, R.L.; WOLF, P.; PETRINI, K.; SIMMONS, L.G.; GROSS, T.; WILDT, D.E. In vitro fertilization and embryo development in vitro and in vivo in the tiger (*Panthera tigris*). **Biol. Reprod.** v.43, p.733–744, 1990.

DONOGHUE, A.M.; HOWARD, J.G.; BYERS, A.P.; GOODROWE, K.L.; BUSH, M.; BLUMER, E.; LUCAS, J.; STOVER, J.; SNODGRASS, K.; WILDT, D.E. Correlation of sperm viability with gamete interaction and fertilization in vitro in the cheetah (*Acinonyx jubatus*). **Biol. Reprod.** v.46, p.1047–1056, 1992.

DOZORTSEV, D.; RYBOUCHKIN, A.; DE SUTTER, P.; DHONT, M. Sperm plasma membrane damage prior to intracytoplasmic sperm injection: a necessary condition for sperm nucleus decondensation. **Hum. Reprod.** v.10, p.2960–2964, 1995

DUMOULIN, J.C.M.; COONEN, E.; BRAS, M.; VAN WISSEN, C.P.L.; IGNOUL-VANVUCHELEN, R.; BERGERS-JANSEN, J.M.; DERHAAG, J.G.; GERAEDTS, J.P.M.; EVERS, J.L.H. Comparison of in-vitro development of embryos originating from either conventional in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. **Hum. Reprod.** v.15, p.402-409, 2000.

DRESSER, B.L.; GELWICKS, E.J.; WACHS, K.B.; KELLER, G.L. First successful transfer of cryopreserved feline (*Felis catus*) embryos resulting in live offspring. **J. Exp. Zool.** v.246, p.180–186, 1988.

DU, F.L.; JIANG, S.; TIAN, X.C.; AVNER, D.; YANG, X. Parthenogenetic activation and somatic nuclear transfer in domestic cats using in vitro matured oocytes. **Theriogenology.** v.57, p.409, 2002

EVENSON, D.; WIXON, R. Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. **Theriogenology**, v. 65, n. 5, p. 979-991, 2006.

FARSTAD, W.. Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. **Anim. Reprod. Sci.** v.60-61, p.375-387, 2000

FILLIERS, M.; T. RIJSSELAERE, T.; BOSSAERT, P.; ZAMBELLI, D.; ANASTASI, P.; HOOGEWIJS, M.; VAN SOOM, A. In vitro evaluation of fresh sperm quality in tomcats: A comparison of two collection techniques. **Theriogenology.** v.74, p.31-39, 2010

FREISTEDT, P.; STOJKOVIC, M.; WOLF, E. Efficient in vitro production of cat embryos in modified synthetic oviduct fluid medium: effects of season and ovarian status. **Biology Reproduction**, v. 65, p. 9-13, 2001.

GABRIEC, A.; MAX, A.; TISCHNER, M. Parthenogenetic activation of domestic cat oocytes using ethanol, calcium ionophore, cycloheximide and a magnetic field. **Theriogenology**. v.67, p.795-800, 2007.

GIANAROLI, L.; MAGLI, M.C.; STANGHELI, I.; CRIPPA, A.; CRIVELLO, PESCATORI, E.S.; FERRARETTI, A.P. DNA integrity is maintained after freeze-drying of human spermatozoa. **Fertil. and Steril.** v.97, p. 1067 – 1073, 2012.

GODARD, N.M.; PUKAZHENTHI, B.S.; WILDT, D.E.; COMIZZOLI, P. Paracrine factors from cumulus-enclosed oocytes ensure the successful maturation and fertilization in vitro of denuded oocytes in the cat model. **Fertility and Sterility**, p.1-11, 2008.

GOMEZ, M.C.; POPE, C.E.; HARRIS, R.; DAVIS, A.; MIKOTA, S.; DRESSES, B.L. Births of kittens produced by intracytoplasmic sperm injection of domestic cat oocytes matured *in vitro*. **Reprod. Fertil. Dev.** v.2, p.423–433, 2000.

GOODROWE, K.L.; WALL, R.J.; O'BRIEN, S.J.; SCHMIDT, P.M.; WILDT, D.E. Developmental competence of domestic cat follicular oocytes after fertilization in vitro. **Biol. Reprod.** v.39, p.355–372, 1988.

GOODROWE, K.L.; MILLER, A.M.; WILDT, D.E.. In vitro fertilization of gonadotrophin-stimulated Leopard Cat (*Felis bengalensis*). follicular oocytes. **J. Exp. Zool.**, v.252, p.89–95, 1989.

GOODROWE, K.L.; HOWARD, J.G.; SCHMIDT, P.M.; WILDT, D.E. Reproductive biology of the domestic cat with special reference to endocrinology, sperm function and in vitro fertilization. **J. Reprod. Fertil.** v.39, p.73–90 (Suppl.), 1989

GOODROWE, K.L.; HAY, M.; KING, W.A. Nuclear maturation of domestic cat ovarian oocytes in vitro. **Biol. Reprod.** v.45, p.466–470, 1991.

GOSDEN, R. Cryopreservation: a cold look at technology for fertility preservation. **Fertility and Sterility**. v. 96, p. 264-268, 2011.

HAINES, G. A.; HENDRY, J. H.; C.; DANIEL, P.; MORRIS, I. D. Increased levels of comet- detected spermatozoa DNA damage following in vivo isotopic- or X-irradiation of spermatogonia. *Mutation Research*, v. 495, p. 21–32, 2001.

HAMANO, K.; LI, X.; QIAN, X. Q.; FUNAUCHI, K.; FURUDATE, M.; MINATO, Y. Gender preselection in cattle with intracytoplasmically injected, flow cytometrically sorted sperm heads. **Biol. Reprod.** v.60, p.1194–1197, 1999.

HEINDRYCKX, B.; VAN DER ELST, J.; DE SUTTER, P.; DHONT, M. Treatment option for sperm- or oocyte-related fertilization failure: assisted oocyte activation following diagnostic heterologous ICSI. **Hum. Reprod.** v.20, p.2237-2241, 2005.

HERRICK, J.R.; BOND, J.B.; MAGAREY, G.M.; BATEMAN, H.L.; KRISHER, R.L.; DUNFORD, A.S.; SWANSON, W.F. Toward a feline optimized culture medium: impact of ions, carbohydrates, essential amino acids, vitamins, and serum on development and metabolism of in vitro fertilization-derived feline embryos relative to embryos grown in vivo. **Biol. Reprod.** v.76, p.858-870, 2007.

HOBBS, R.J.; HOWARD, J.; WILDT, D.E.; COMIZZOLI, P. Absence of seasonal changes in FSHR gene expression in the cat cumulus–oocyte complex *in vivo* and *in vitro*. **Reproduction**. v.144, p. 111-122, 2012.

HOFFERT, K.A.; ANDERSON, G.B.; WILDT, D.E.; ROTH, T. Transition from maternal to zygotic control of development in IVM/IVF domestic cat embryos. **Mol. Reprod. Dev.** v.48, p.208–215, 1997.

HOSHI, K.; YANAGIDA, K.; YAZAWA, H.; KATAYOSE, H.; SATO, A. Pregnancy and Delivery After Intracytoplasmic Injection of an Immobilized, Killed Spermatozoon into an Oocyte. **J. Assist. Reprod.** v.11, p.325-326, 1994.

HOWARD, J.G.; BUSH, M.; WILDT, D.E. Semen collection, analysis and cryopreservation in nondomestic mammals. In: **Morrow DA, editor. Current therapy in theriogenology, WB Saunders Philadelphia**, p.1047–53, 1986.

HRIBAL, R.; JEWGENOW, K.; BRAUN, B.C.; COMIZZOLI, P. Influence of culture medium composition on relative mRNA abundances in domestic cat embryos. **Reprod. Dom. Anim.** v.48, p. 245-251, 2013.

JANNY, L.; MENEZO, Y.J.R. Evidence for a strong paternal effect on human preimplantation embryo development and blastocyst formation. **Mol. Reprod. Dev.** v.38, p.36-42, 1994.

JOHNSTON, L.A.; O'BRIEN, S.J.; WILDT, D.E. In vitro maturation and fertilization of domestic cat follicular oocytes. **Gamete Research**, v.24, p.343- 356, 1989.

JOHNSTON, L.A.; DONOGHUE, A.M.; O'BRIEN, S.J.; WILDT, D.E. Culture medium and protein supplementation influence in vitro fertilization and embryo development in the domestic cat. **J. Exp. Zool.** v.257, p.350 – 359, 1991.

KAMIGUCHI, Y.; TATENO, H.; IIZAWA, Y.; MIKAMO, K. Chromosome analysis of human spermatozoa exposed to antineoplastic agents in vitro. **Mutat. Res.** v.326, p.185–192, 1995.

KANEKO, T. New possibilities of sperm freeze-drying. **J. Fert. In Vitro.** v.2 (5), 2012.

KANEKO, T.; KIMURA, S.; NAGATA, N. Offspring derived from oocytes injected with rat sperm, frozen or freeze-dried without cryoprotection. **Theriogenology.** v.68, p. 1017-1021, 2007.

KANEKO, T.; NAKAGATA, N. Relation between storage temperature and fertilizing ability of freeze-dried mouse spermatozoa. **Comp. Med.** v.55, p.140-144, 2005.

KANEKO, T.; WHITTINGHAM, D.G.; YANAGIMACHI, R. Effect of pH value of freeze-drying solution on the chromosome integrity and developmental ability of mouse spermatozoa. **Biol Reprod.** v.68, p.136–139, 2003.

KANEKO T, SERIKAWA T Long-term preservation of freeze-dried mouse spermatozoa. **Cryobiology** v.64, p.211-214, 2012.

KARJA, N.W.K.; OTOI, T.; MURAKAMI, M.; YUGE, M.; FAHRUDIN, M.; SUZUKI, T. Effect of protein supplementation on development to the hatching and hatched blastocyst stages of cat IVF embryos. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 14, p. 291-296, 2002.

KAWASE, Y.; SUZUKI, H. A study on freeze-drying as a method of preserving mouse sperm. **J. Reprod. Dev.** v.57, p.176-182, 2011.

KAWASE, Y.; ARAYA, H.; KAMADA, N.; JISHAGE, K-I.; SUZUKI, H. Possibility of long-term preservation of freeze-dried mouse spermatozoa. *Biology of reproduction*. v.72, 568-573, 2005.

KAWASE, Y.; WADA, N.A.; JISHAGE, K. Evaluation of DNA fragmentation of freeze-dried mouse sperm using a modified sperm chromatin structure assay. **Theriogenology**. v.72, p.1047-1053, 2009.

KHURANA, N. K.; NIEMANN, H. Energy metabolism in preimplantation embryos derived in vitro or in vivo. **Biol. Reprod.** v.62, p.847–56, 2000.

KIMURA, Y.; YANAGIMASHI, R. Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. **Biol. Reprod.** v.52, p.709-720, 1995.

KLINCUMHOM, N.; THONGPHAKDEE, A.; TECHAKUMPHU, M.; CHATDARONG, K. Time of the first embryonic cleavage indicates cat blastocyst quality. **Thai j. Vet. Med.** v.42, p.67-72, 2012.

KRISHER, R.L. *In vivo* and *in vitro* environmental effects on mammalian oocyte quality. **Annu. Rev. Anim. Biosci.** v.1, p.393-417, 2013.

KUSAKABE, H.; KAMIGUCHI, Y. Chromosomal integrity of freeze- dried mouse spermatozoa after 137Cs-c-ray irradiation. **Mutat. Res.** v.556, p.163–168, 2004.

KUSAKABE, H.; KAMIGUCHI, Y.; YANAGIMACHI, R. Mouse and human spermatozoa can be freeze-dried without damaging their chromo- somes. **Hum. Reprod.** v.23, p.233–239, 2008.

KUSAKABE, H.; SZCZYGIEL, M.A.; WHITTINGHAM, D.G.; YANAGIMACHI,R.; Maintenance of genetic integrity in frozen and freeze-dried mouse spermatozoa. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 98, p. 13501-13506, 2001.

LAZZARI, G.; CROTTI, G.; TURINI, P.; DUCHI, R.; MARI, G.; ZAVAGLIA, G.; Equine embryos at the compacted morula and blastocyst stage can be obtained by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) of in vitro matured oocytes with frozen–thawed semen of different fertility. **Theriogenology**. v.58, p.709-712, 2002.

LI, M. W.; WILLIS, B. J.; GRIFFEY, S. M.; SPEAROW, J. L.; LLOYD, K. C. Assessment of three generations of mice derived by ICSI using freeze-dried sperm. *Zygote*, v.7, p.239–251, 2009

LIU, J.-L.; KUSAKABE, H.; CHANG, C.-C.; SUZUKI, H.; SCHMIDT, D.W.; JULIAN, M.; PFEFFER, R.; BORMANN, C.L.; TIAN, X.C.; YANAGIMACHI, R.E.; YANG, X. Freeze-dried sperm fertilization leads to full-term development in rabbits. **Biol Reprod.**, v.70, p.1776 – 1781, 2004.

LOPES, M.D.; UIECHI, E.; TRINCA, L.A. Avaliação da maturação nuclear in vitro de oócitos de gatas domésticas (*Felis catus*) pré-púberes e púberes. **Braz J Vet Res Anim Sci**, v.41(4), p.268-273, 2004.

LOSKUTOFF, N.M.; BARTELS, P.; MEINTJES, M.; GODKE, R.A.; SCHIEWE, M.C. Assisted reproductive technology in nondomestic ungulates: a model approach to preserving and managing genetic diversity. **Theriogenology** v.443, p.3–12, 1995.

LOUTRADI, K.E.; TARLATZIS, B.C.; GOULIS, D.G.; ZEPIRIDIS, L.; PAGOU, T.; CHATZIOANNOU, E.; GRIMBIZIS, G.F.; PAPADIMAS, I.; BONTIS, I. The effects of sperm quality on embryo development after intracytoplasmic sperm injection. **J. Assist. Reprod. and Genetics**. v.23, p.69-74, 2006.

LUVONI, G.C. Current progress on assisted reproduction in dogs and cats: in vitro embryo production. **Reprod. Nutr. Dev.**, v.40, p.502-512, 2000.

LUVONI, G.C.; OLIVA, O. Effect of medium-199 and fetal calf serum on in vitro maturation of domestic cat oocytes. **J. Reprod. Fertil.** v.47, p.203–207, (Suppl.), 1993.

MAGALHÃES L.C.O. Efeito da liofilização sobre o sêmen congelado de cães e gatos. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 102f., 2010.

MARTINS, C.F. *Liofilização de espermatozóides bovinos: viabilidade estrutural e funcional*. 2006. 111f. Tese (Doutorado) – Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília.

MELLON, J.D. Factors influencing reproductive success in small captive exotic felids (*Felis* spp.): a multiple regression analysis. **Zoo Biol.** v.10, p.95–110, 1991.

MILLER, A.M.; ROELKE, M.E.; GOODROWE, K.L.; HOWARD, J.G.; WILDT, D.E. Oocyte recovery, maturation and fertilization in vitro in the puma (*Felis concolor*). **J. Reprod. Fertil.** v.88, p.249–258, 1990.

MORO, L.N.; SLAMONE, D.F. Development of domestic cat embryos generated by intracytoplasmic sperm injection exposed to ionomycin activation and different culture conditions. **Reprod. Fertil. Dev.** v. 23(1), p.241-242, 2010.

MURAKAMI, M.; OTOI, T.; KARJA, N.W.K.; OOKA, A.; SUZUKI, T. Effects of serum-free culture media on in vitro development of domestic cat embryos following in vitro maturation and fertilization. **Reprod. Dom. Anim.**, v. 37, p. 352-356, 2002.

NAGANO, M.; UCHIKURA, K.; TAKAHASHI, Y.; HISHINUMA, M. Effect of duration of *in vitro* maturation on nuclear maturation and fertilizability of feline oocytes. **Theriogenology**, v.69, p.231–236, 2008.

NAKAI, M.; KASHIWAZAKI, N.; ITO, J.; MAEDOMARI, N.; OZAWA, M.; SHINO, M.; NOGUSHI, J.; KANEKO, H.; KIKUCHI, K. Factors affecting fertilization and embryonic development during intracytoplasmic sperm injection in pigs. **J. Reprod. Develop.** v.57, p.183-187, 2011.

NAKAI, M.; KASHIWAZAKI, N.; TAKIZAWA, A.; HAYASHI, Y.; NAKATSUKASA, E.; FUCHIMOTO, D.; NOGUCHI, J.; KANEKO, H.; SHINO, M.; KIKUCHI, K. Viable piglets generated from porcine oocytes matured in vitro and fertilized by intracytoplasmic sperm head injection. **Biol Reprod.** v.68, p.1003–1008, 2003.

NAKAI, M.; KASHIWAZAKI, N.; TAKIZAWA, A.; MAEDOMARI, N.; OZAWA, M.; NOGUSHI, J.; KANEKO, H.; SHINO, M.; KIKUCHI, K. Effects of chelating agents during freeze-drying of boar spermatozoa on DNA fragmentation and on developmental ability *in vitro* and *in vivo* after intracytoplasmic sperm head injection. **Zygote**. v.15: p.15–24, 2007.

NAVES, C.S.; BELETTI, M.E.; DUARTE, M.B.; VIEIRA, R.C.; DINIZ, E.G.; JACOMINI, J.O.; Avaliação da cromatina espermática em eqüinos com azul de toluidina e acridine orange. **Bioscience Journal**, v.20, n.3, p.117-124, 2004.

PALERMO, G.D.; ALIKANI, M.; BERTOLI, M.; COLOMBERO, L.T.; MOY, F.; COHEN, J.; ROSENWAKS, Z. Oolemma characteristics in relation to survival and fertilization patterns of oocytes treated by intracytoplasmic sperm injection. **Hum. Reprod.** v.11, p.172-176, 1996.

PLACHOT, M. *In vitro* maturation of human oocytes. **Contracept. Fertil. Sex.** v.27, p.434–439, 1999.

POPE, C.E. Embryo technology in conservation efforts for endangered felids. **Theriogenology.** v.53, p.163-174, 2000.

POPE, C.E.; GELWICKS, E.J.; WACHS, K.B.; KELLER, G.L.; MARUSKA, E.J.; DRESSER, B.L. Successful interspecies transfer of embryos from the Indian Desert cat (*Felis silvestris ornata*) to the domestic cat (*Felis catus*) following in vitro fertilization. **Biol. Reprod.** v.40 (1), p.61, (Suppl.) (abstr.), 1989.

POPE, C.E.; GOMÉZ, M.C.; DRESSER, B.L. *In vitro* production and transfer of cat embryos in the 21st century. **Theriogenology**, v.66, p.59-71, 2006.

POPE, C.E.; GOMÉZ, M.C.; KAGAWA, N.; KUWAYAMA, M.; LEIBO, S.P.; DRESSER, B.L. *In vivo* survival of domestic cat oocytes after vitrification, intracytoplasmic sperm injection and embryo transfer. **Theriogenology.** v.77, p.531-538, 2012

POPE, C.E., JOHNSON, C.A., MCRAE, M.A., KELLER, G.L., DRESSER, B.L. Development of embryos produced by intracytoplasmic sperm injection of cat oocytes. **Anim. Reprod. Sci.** v.53, p.221–236, 1998.

POPE, C.E.; KELLER, G.L.; DRESSER, B.L. In vitro fertilization in domestic and nondomestic cats including sequences of early nuclear events, in vitro development, cryopreservation and successful intra and interspecies embryo transfer. **J. Reprod. Fertil.** v.47, p.189–201(Suppl.), 1993.

POPE, C.E.; MCRAE, M.A.; PLAIR, B.L.; KELLER, G.L.; DRESSER, B.L. In vitro and in vivo development of embryos produced by in vitro maturation and in vitro fertilization of cat oocytes. **J. Reprod. Fertil.** v.51, p.69–82, (Suppl.), 1997.

POPE, C.E.; MCRAE, M.A.; PLAIR, B.L.; KELLER, G.L.; DRESSER, B.L. Successful in vitro and in vivo development of in vitro fertilized two- to four-cell cat embryos following cryopreservation, culture and transfer. **Theriogenology** v.42, p.513–525, 1994a.

POPE, C.E.; MCRAE, M.A.; PLAIR, B.L.; DRESSER, B.L. Blastocyst development *in vitro* following maturation, fertilization and culture of domestic cat oocytes. **Biol. Reprod.** v.50, p.179, 1994b.

POPE, C.E.; JOHNSON, C.A.; MCRAE, M.A.; KELLER, G.L.; DRESSER, B.L. Development of embryos produced by intracytoplasmic sperm injection of cat oocytes. **Ani Reprod Sci**, v. 53, p. 221–236, 1998.

POPE, C.E.; SCHMID, R.; DRESSER, D.L. In vitro development of cat embryos produced by in vitro fertilization is enhanced by addition of cysteine to the maturation medium and a reduced O₂ atmosphere. **Theriogenology**. v.51, p.291 (Abstr.), 1999.

PRINOSILOVA, P.; RYBAR, R.; ZAJICOVA, A.; HLAVICOVA, J. DNA integrity in fresh, chilled and frozen-thawed canine spermatozoa. **Veterinarni Medicina**. v.57, p.133-142, 2012.

PROBST S, RATH D. Production of piglets using intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with flowcytometrically sorted boar semen and artificially activated oocytes. **Theriogenology** v.59, p.961–973, 2003

RASCADO, T.S. Produção de embriões por fecundação *in vitro* e ativação partenogénica visando o isolamento de células tronco embrionárias felinas. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, p.130f, 2009.

ROTH, T.L.; SWANSON, W.F.; WILDT, D.E. Developmental competence of domestic cat embryos fertilized in vivo versus in vitro. **Biol. Reprod.** v.51, p.441–451, 1994.

SCHRAMM, R.D.; BAVISTER, B. Effects of gonadotrophins, growth hormone and prolactin on developmental competence of domestic cat oocytes matured in vitro. **Reprod. Fertil. Dev.** v.7, p.1061–1066, 1995.

SHAHAM, G. Apparatus, system and method for lyophilization. 2005. Disponível em:<<http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?IA=IL2005000124>>. Acesso em: 10 junho 2011.

SHIRAZI, A.; OSTAD-HOSSEINI, S.; AHMADI, E.; HEIDARI, B.; SHAMS-ESFANDABADI, N. In vitro developmental competence of ICSI-derived activated ovine embryos. **Theriogenology**. v.71, p.342-348, 2009.

SILVA, L.D.M.; SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; LIMA, A.K.F.; SILVA, T.F.P. Biotécnicas aplicadas à reprodução de cães e gatos. In: Biotécnicas aplicadas à reprodução animal, 2ª. ED., p.181-199, 2008.

SILVA, T.M.R. O uso de altrenogest para protocolos de reprodução assistida em gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), Dissertação. Universidade Federal do Paraná, 2009.

SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell Res.**, v. 175, p. 184-191, 1988.

SOARES, M.P.; ROSSI, C.A.R.; MEZZALIRA, A.; CECIM, M. Etileno glicol na crioprervação de sêmen canino. **Ciência Rural** v.32, n. 4, p. 649-655, 2002.

SOJKA, N.J.; JENNINGS, L.L.; HAMNER, C.E. Artificial insemination in the cat (*Felis catus*). **Lab. Anim. Care** v.20, p.198–204, 1970.

SOTOLONGO, B.; HUANG, T.T.F.; ISENBERGER, E.; WARD, W.S. An endogenous nuclease in hamster, mouse, and human spermatozoa cleaves DNA into loop-sized fragments. **J. Androl.** v.26, p.272–280, 2005.

SPINDLER, R.E.; WILDT, D.E.; Relationship of substrate metabolism to cat oocyte maturation. **Theriogenology**. v.51, p.295, (abstr.), 1999.

SPINDLER, R.E.; PUKAZHENTHI, B.S.; WILDT, D.E. Oocyte metabolism predicts the development of cat embryos to blastocyst in vitro. **Mol. Reprod. Dev.** v.56, p.163–71, 2000.

SWANSON, W.F. Laparoscopic Oviductal Embryo Transfer and Artificial Insemination in Felids – Challenges, Strategies and Successes. **Reprod. Dom. Anim.** v.47 (Suppl.6), p.136-140, 2012.

SWANSON, W.F. Application of assisted reproduction for population management in felids: The potential and reality for conservation of small cats. **Theriogenology.** v.66, p.49-58, 2006.

SWANSON, W.F.; ROTH, T.L.; GODKE, R.A. Persistence of the developmental block to temporal variations in culture conditions. **Mol. Reprod. Dev.** v.43, p.298–305, 1996.

SZCZYGIEL, M.A.; KUSAKABE, H.; YANAGIMACHI, R.; WHITTINGHAM, D.G. Intracytoplasmic sperm injection is more efficient than in vitro fertilization for generating mouse embryos from cryopreserved spermatozoa. **Biol. Reprod.** v.67, p.1278-1284, 2002.

TATENO, H.; KAMIGUCHI, Y.; SHIMADA, M.; MIKAMO, K. Difference in types of radiation-induced structural chromosome aberrations and their incidences between Chinese and Syrian hamster spermatozoa. **Mutat. Res.** v.350, p.339–348, 1996.

TOSTI, E., BONI, R., CUOMO, A. Fertilization and activation currents in bovine oocytes. **J. Reprod. Fertil.** v.124, p.835–846, 2002.

TROUNSON, A.; ANDERIESZ, C.; JONES, G. M.; KAUSCHE, A.; LOLATGIS, N.; WOOD, C. Oocyte maturation. **Hum. Reprod. Suppl.** 3, p.52–62. 1998.

TSUITSUI, T.; MIZUTANI, T.; MATSUBARA, Y.; TOYONAGA, M.; OBA, H.; HORI, T. **J. Vet. Med. Sci.** v.73, p.259-262, 2011.

TSUJIOKA, T.; OTZDORFF, C.; BRAUNN, J.; HOCHI, S. Effect of post-IVF developmental kinetics on *in vitro* survival of vitrified-warmed domestic cat blastocysts. **Reprod. Dom. Anim.** v.43, p.323-327, 2008.

VAN STEIRTEGHEM, A.C.; NAGY, Z.; JORIS, H.; LIU, J.; STAESSEN, C.; SMITZ, J.; WISANATO, A.; DEVROEY, P. High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. **Hum. Reprod.** v.8, p.1061– 1066, 1993.

VILLAVERDE, A.I.S.B. Comparação entre dois métodos de inseminação artificial utilizando sêmen congelado em gatos domésticos (*Felis catus*). Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 117p. 2007.

VILLAVERDE, A.I.S.B.; MELO, C.M.; MARTIN, I.; FERREIRA, T.H.; PAPA, F.O.; TACONELI, C.A.; LOPES, M.D. Comparison of efficiency between two artificial insemination methods using frozen–thawed semen in domestic cat (*Felis catus*) Artificial insemination in domestic cats. **Anim. Reprod. Sci.** v.114, p.434-442, 2009.

WAKAYAMA, T.; YANAGIMACHI, R. Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. **Nat. Biotechnol.**, v.16, p.639–641, 1998.

WARD, M.A.; KANEKO, T.; KUSAKABE, H.; BIGGERS, J.D.; WHITTINGHAM, D.G.; YANAGIMACHI, R. Long-term preservation of mouse spermatozoa after freeze-drying and freezing without cryoprotection. **Biol. Reprod.**, v.69, p. 2100-2108, 2003.

WILDT, D.E.; PHILLIPS, L.G.; SIMMONS, L.G.; CHAKRABORTY, P.K.; BROWN, J.L.; HOWARD, J.G.; TEARE, A.; BUSH, M. A comparative analysis of ejaculate and hormonal characteristics of the captive male cheetah, tiger, leopard and puma. **Biol. Reprod.** v.38, p.245–255, 1988.

WILDT, D.E.; MONFORT, S.L.; DONOGHUE, A.M.; JOHNSTON, L.A.; HOWARD, J. Embryogenesis in conservation biology—or how to make an endangered species embryo. **Theriogenology** v.37, p.161–184, 1992.

WOLFE, B.A.; WILDT, D.E. Development to blastocysts from in vitro maturation and fertilization of domestic cat oocytes following prolonged cold storage ex situ. **J. Reprod. Fertil.** v.106, p.135–141.,1996.

WOOD, T.C.; BYERS, A.P.; JENNETTE, B.E.; WILDT, D.E. Influence of protein and hormone supplementation on in vitro maturation and fertilization of domestic cat eggs. **J. Reprod. Fertil.** v.104, p.315–323, 1995.

WOOD, T.C.; MONTALI, R.J.; WILDT, D.E. Follicle oocyte atresia and temporal taphonomy in cold stored domestic cat ovaries. **Mol. Reprod. Dev.** v.46, p.190–200, 1997.

WOOD, T.C.; WILDT, D.E. Effect of the quality of the cumulus-oocyte complex in the domestic cat on the ability of oocytes to mature, fertilize and develop into blastocyst in vitro. **J. Reproduction and Fertility.** v.110, p.355-360, 1997.

YOSHIDA, N.; PERRY, A.C.F. Piezo-actuated mouse intracytoplasmic sperm injection (ICSI). **N. Prot.** v.2, p.296-304, 2007.

Trabalho publicado

9) Trabalho publicado

Trabalho publicado na revista Animal Reproduction

9.1 Normas de publicação

ANIMAL REPRODUCTION

Instructions to authors

The Animal Reproduction–AR publishes original scientific papers and invited literature reviews, with a goal of contributing to a better understanding of phenomena related to animal reproduction.

All correspondence should be sent to: Editor Animal Reproduction Alameda das Princesas 1275 – Bairro São José 31275-180 – Belo Horizonte, MG – Brasil Tel.: +55 (31) 3491-7122 - Fax: +55 (31) 3491-7025 E-mail: animreprod@cbra.org.br

Submission of Manuscripts All manuscripts must be original and copyright should be transferred to the AR. The authors are entirely responsible for all data, concepts and information contained in the article. Manuscripts should be sent preferentially by email or by regular post on a PC readable CD-ROM, properly identified and accompanied by a copy of the written manuscript. Illustrations should be sent as separate files.

All manuscripts must be written in Standard American English. We recommend Merriam-Webster's Dictionary (Merriam-Webster's Online: <http://www.m-w.com/>) for spelling check. Authors whose native language is not English are strongly advised to have their manuscripts checked by a reviewer familiar with scientific language and vocabulary. Manuscripts not written in acceptable Standard English will be returned to the author before being sent to the scientific reviewers. Manuscripts accepted for publication will be submitted to a final review of English by the Journal and the final version will be sent to the author for approval. The manuscripts that are not accepted will be returned to the authors. The AR Editors goal is to have the first decision about the acceptance or not of the manuscript in a time period of thirty days.

Units of measurements, Abbreviations and Symbols Units of measurements must be used according to the international System of Units. Abbreviations and Symbols – Avoid them unless using standard units of measurement.

Complementary Information The author is entitled to ten reprints. Copies and translation of any article for commercial use are prohibited and publication in other scientific journals must be approved by the AR.

Revision Process Manuscripts will be submitted to at least two reviewers and will be returned to the authors for final editing according to the reviewers suggestions. The revised manuscript should be sent to the Editor.

Preparation of Manuscripts 1. Text Format and Files: Type all pages to A4 (21.0 x 29.7), with 3 cm margins, Times New Roman source 12, continuously and without formatting, double spaced, with numbered lines and numbered pages. The electronic file (.doc) should be formatted to MICROSOFT WORD (6.0 version or superior).

2. Manuscript Sections i. Title page ii. Abstract iii. Introduction iv. Materials and Methods v. Results vi. Discussion vii. References viii. Acknowledgements ix. List of abbreviations used x. Tables xi. Figures

3. Title page: The title should be succinct but include the study design and major topics. a. Title words should be in bold, with only the first letter of the first word in upper case. b. Author names are to be listed below the title, only the surname in full (first and middle names will be represented by the first letter followed by a period). Follow each name with exponents in Arabic numerals to indicate affiliations and addresses (e.g.: R.A. Hess¹; K. Carnes²). c. Addresses should be listed below the author names and in numerical order. d. Corresponding author should be listed next with complete mailing address, phone and fax number, and email address. e. Article type: indicate the area in which the article fits best: Basic Research, Biotechnology or Applied Research. f. Running title: no more than 50 letters, including spaces.

4. Abstract: State clearly the purpose of the work, indicate the methods used and summarize conclusions. Limit: 300 words. Keywords should be listed after the abstract. Maximum of 5 keywords.

5. Introduction: This section should provide background information leading up to the hypothesis tested. The section should end with a very brief statement of the objectives of the work.

6. Methods: Should include the design of the study, type of materials involved, number of animals per group, a clear description of all methods used and/or clear references to published methods, and the type of analysis used.

7. Results: The results section may be broken into subsections with short, informative headings. State clearly and objectively the main results found.

8. Discussion: This section may be broken into subsections with short, informative headings. The discussion should be focused on the results found. It is recommended that the main conclusions supported by the research data be stated as a last paragraph.

9. Acknowledgments: Should be briefly expressed. Grant support with the author initials (i.e., DHP) should be indicated in this section..

10. Tables: A set of alphanumerical data that is organized in lines and columns. Begin each table on a new page. Tables must be as simple as possible and only horizontal lines should be used at the top and bottom of the table. The table legend, at the top, must receive initially the word Table, followed by its number in Arabic numerals and referred to in the text as Table. The legends of the tables must be sent separately.

12. Figures and figure legends: Any illustration that contains line drawings, photographs, graphics, schemes, fluxograms etc. are considered as figures. They should be identified and sent in separate file. The list of table titles and figure legends should begin on a new page within the text. In the text refers to the figures in the numerical order that they are listed; i.e., Fig. 1, Fig. 2, Figs. 1-2, etc. The legends of the figures must be sent separately.

13. References: Begin the reference list on a new page. Please see below examples for references cited in the text and for the reference list.

TEXT CITATION - Indication of the source parenthetically after the citation in order to avoid interruption in the sequence of the text. In case the names of the authors are integrated in the text, the date of publication is mentioned between parenthesis, after the name of the author, according to the examples: a) sole author: (Ginther, 1992) or Ginther (1992). b) two authors: (Varley and Foxcroft, 1990) or Varley and Foxcroft (1990). c) more than two authors: (Quintero et al., 2000) or Quintero et al. (2000). d) more than one paper cited: (Varley and Foxcroft, 1990; Ginther, 1992; Gastal et al., 1999a; b; Quintero et al., 2000) or Varley and Foxcroft (1990); Ginther (1992); Gastal et al., (1999a; b); Quintero et al. (2000), always cited in ascending chronological order.

REFERENCE LIST - Cite only referred, published work. Use "in press" only when formal acceptance has been granted. References must be listed in alphabetical order.

- For PERIODICALS Gastal EL, Gastal MO, Ginther OJ. 1999a. Experimental assumption of dominance by a smaller follicle and associated hormonal changes in mares. *Biol Reprod*, 61:724–730. Gastal EL, Donadeu FX, Gastal MO, Ginther OJ. 1999b. Echotextural changes in the follicular wall during follicle deviation in mares. *Theriogenology*, 52:803-814. Hess RA, Carnes K. 2004. The role of estrogen in testis and the male reproductive tract: a review and species comparison. *Anim Reprod*, 1:5-30. Sartori R, Souza AH, Guenther JN, Caraviello DZ, Geiger LN, Schenk JL, Wiltbank MC. 2004. Fertilization rate and embryo quality in superovulated Holstein heifers artificially inseminated with X-sorted or unsorted sperm. *Anim Reprod*, 1:86-90, 2004. Varley MA, Foxcroft GR. 1990. Endocrinology of lactating and weaned sow. *J Reprod Fertil Suppl*, 40:47-61.

- For OTHER DOCUMENTS than periodicals Basrur PK, Yusoff RBH. 1997. Sex anomalies in goats. In Youngquist, RS (Ed.). *Current therapy in large animal theriogenology*. Philadelphia, USA: WB Saunders. pp.553-290 Ginther OJ. 1992. *Reproductive biology of the mare: Basic and applied aspects*. 2.ed. Cross Plains, WI, USA: Equiservices Publishing. pp.105-172. Leal MC. 2004. *Morphometric and functional analyses of testis and spermatogenic efficiency in the marmoset (Callithrix penicillata) [in Portuguese]*. Belo Horizonte, Brazil: Federal University of Minas Gerais. Thesis. Quintero B, Porter M, Sharp D, Cleaver B, Diaz T. 2000. Effect of season on LH concentrations and LH pulse dynamics in mares located in the tropics. In *Abstracts of the 14th International Congress on Animal Reproduction*, 2000, Stockholm, Sweden. Stockholm: ICAR. pp .290.

- For ELECTRONIC DOCUMENTS CD-ROM Anderson SC, Poulsen KB. 2002. *Anderson's electronic atlas of hematology [CD-ROM]*. Philadelphia: Lippincott

Williams & Wilkins. Journal article on the Internet Abood S. 2002. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. *Am J Nurs* [serial on the Internet], 102: 3pp. Available in: <http://www.nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htm>. Accessed in: Aug 12th 2002. Monograph on the Internet Foley KM, Gelband H. (Eds.). 2001. Improving palliative care for cancer [monograph on the Internet]. Washington: National Academy Press. Available from: <http://www.nap.edu/books/0309074029/html/>. Accessed in: July 9th. 2002. Homepage/Web site Cancer-Pain.org [homepage on the Internet]. 2002. New York: Association of Cancer Online Resources, Inc. Available in: <http://www.cancer-pain.org/>. Accessed in: Jul 9th. 2002. Part of a homepage/Web site American Medical Association [homepage on the Internet]. 2001. Chicago: The Association. Available from: <http://www.ama-assn.org/ama/pub/category/1736.html>. Accessed in: Aug 12th. 2002. Database on the Internet Open database: Who's Certified [database on the Internet]. 2000. Evanston, IL: The American Board of Medical Specialists. Available from: <http://www.abms.org/newsearch.asp>. Accessed in: Mar 8th. 2001. Closed database: Jablonski S. 2001. Online Multiple Congenital Anomaly/Mental Retardation (MCA/MR) syndromes [database on the Internet]. Bethesda, MD: National Library of Medicine. Available from: http://www.nlm.nih.gov/mesh/jablonski/syndrome_title.html. Accessed in: Aug 12th. 2002. Part of a database on the Internet MeSH Browser [database on the Internet]. 2002. Bethesda, MD: National Library of Medicine. Meta-analysis; unique ID: D015201; [3pp.]. Available from: <http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html> Files updated weekly. Accessed in: Jun 10th. 2003.

- NON PUBLISHED WORK – Should be mentioned only in the text and not in the list of references.

- VERBAL INFORMATION- References concerning unpublished data and “personal communications” should not be cited in the reference list but should be mentioned in the text. After the information, the author must put the expression “verbal information” or “personal communication”)

13. There is no page charges and figures limit. Particularly in case of colorful pictures please contact the editors.

14. If you have any question please report to the Animal Reproduction Website (<http://www.cbpa.org.br/animreprod>) and see previously published articles.



Preservation of wild feline semen by freeze-drying: experimental model

L.C.O. Magalhães¹, C.M. Melo-Oña, M.J. Sudano, D.M. Paschoal, L.F. Crocomo, C.L. Ackermann, F.C. Landim-Alvarenga, M.D. Lopes

Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology, FMVZ-UNESP, Botucatu, SP, Brazil.

Abstract

According to the Convention on International Trade in Endangered Species, 36 wild feline species are threatened by extinction or severely endangered, and to save them is the target of several conservation programs. This study aimed to assess the viability of the freeze-drying technique for domestic cat sperm cells, with the ultimate goal of transferring this technology to the wild feline species. The domestic cat is an excellent experimental model for wild felids. It is in this scenario that the freeze-drying process (low-temperature vacuum dehydration) of sperm cells shows its value in preserving male cats' germplasm. Results from membrane and DNA integrity analysis are promising and validates the use of frozen-dried sperm samples in intracytoplasmic sperm injections (ICSI). Further studies are still necessary to evaluate the ICSI embryo production using domestic cat frozen-dried sperm and the possibility of using such technology with wild felines.

Keywords: cat, DNA integrity, frozen-dried sperm, wild felines.

Introduction

For decades, major investments have been made in biotechnology to preserve sperm cells in order to perpetuate and multiply important genetic material. The most widespread technology to preserve sperm cells is the freezing process using liquid nitrogen to form a germplasm bank and preserve genetic material.

Assisted reproduction biotechnologies had a leaping development in species of economic interest. In carnivores such progress in biotechnologies occurred only when bonds between humans and domestic animals were strengthened (Soares *et al.*, 2002).

As for the domestic cat, there has been an increasing interest in the collection, evaluation and cryopreservation of its semen. The ability of collecting and preserving feline semen in low temperatures provides not only an exchange of genetic diversity among domestic cat breeds (*Felis silvestris catus*), but also an extensive use of sperm of high-genetic-valued tomcats. It also reduces the transmission of infectious diseases (Siemieniuch and Dubiel, 2007) and may help the conservation of wild felids (e.g. *Leopardus pardalis*, *Leopardus tigrinus*, and *Leopardus geoffroyi*). The domestic cat is considered an excellent research model

for wild felids. Thirty-six wild felid species are threatened by extinction or severely endangered (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Flora and Fauna - CITES, 1973) and to save them is the target of several conservation programs (Siemieniuch and Dubiel, 2007).

It is in this scenario that the freeze-drying process (low-temperature vacuum dehydration) of sperm cells shows its value in preserving male germplasm with several advantages (Martins, 2006).

The freeze-drying technique is useful because of the following reasons: 1) transportation becomes easy, thus facilitating the import and/or export of important gene pools; 2) it reduces storage costs, since there is no need to refill liquid nitrogen containers; 3) it helps assisted reproduction in animals and humans; 4) it preserves genetic lines of various species, rare breeds and transgenic lineages; 5) it facilitates the study of species and breeds characterization by using genetic markers (Martins, 2006).

Therefore, developing a technique that is not only cheaper, but also more practical to preserve and store wild felid sperm cells is a must. Our interest in freeze-drying domestic cat sperm is based in the possibility of using such technology with wild felids, especially the ones that are on the verge of extinction. The objective of our study was to evaluate the feasibility of such technique for domestic cat sperm.

Cryopreservation

There are at least two stress moments that the sperm cells undergo during the freezing and thawing processes. The first one is related to the effects of temperature change, and the second is the formation and dissolution of ice crystals.

Cold shock refers to the peculiar sensitivity of spermatozoa to the refrigeration process (Watson, 1981; Watson and Morris, 1987; White, 1993).

Sperm cells show membrane integrity loss and cell dysfunction when they are fast cooled in the interval between 20 and 0°C. The severity of this effect depends on the cooling rate, temperature interval, and temperature amplitude. In general, it is more severe in the 12 to 2°C amplitude (Watson, 1981). It remains unclear the reason for this phenomenon, but it is probably correlated with the transitional phases of membrane lipids that lose their selective permeability

¹Corresponding author: luismagalhaesona@gmail.com

Phone: +55(14)3813-1398; Fax: +55(14)3811-6249

Received: June 29, 2012

Accepted: August 6, 2012



after going through changes (Watson and Morris, 1987).

However, after 60 yr of semen cryopreservation research, many aspects of the process are still unknown (Saragusty *et al.*, 2009a), and much of the progress in this field is empirical in nature (e.g. Saragusty *et al.*, 2009b). Different species may present spermatozoa of different shapes, sizes, membrane composition, osmotic pressure, sensitivity to chilling, and pH as well as other differences. Such items need to be characterized in order to design the most suitable cryopreservation protocol for each species.

There is evidence that frozen/thawed cells suffer injuries during thawing and this occurs due to the re-crystallization of microscopic ice crystals (Fiser and Fairfull, 1986).

Freeze-drying

Nowadays, the most common method to store mammal sperm cells for long periods of time is in liquid nitrogen (N₂). The period of time that these cells can be stored under this condition depends on storage costs, since the constant need of N₂ refilling may be costly. Thus, it is necessary to provide a storage technique for sperm cells that has low costs and that may be used in both *in vitro* and *in vivo* fertilization (Cabrera *et al.*, 1998).

The freeze-drying process is a technique that aims to preserve cells through the freezing of one substance followed by the reduction of one of the solvents, usually water, via sublimation and desorption to levels in which there is no chemical or biological reaction. The temperature and water vapor pressure must be lower than the triple point, which means to have 273.16 kelvin (0.01°C) and 611.73 pascal (#0.006 bar). Under these conditions and with a 2.84 MJ/kg latent heat, ice turns directly into vapor.

The advantage of the freeze-drying process is the fact that spermatozoa may be stored at room temperature for long periods and then be recovered with morphologically intact heads, containing normal DNA, and intact tails (Cabrera *et al.*, 1998).

After freeze-drying, the connection between spermatozoa head and tail becomes fragile and simple pipetting may easily disconnect head and tail. Moreover, many spermatozoa have their acrosome detached after rehydration (Magalhães, 2010). Despite all these physical changes in the sperm structure, the freeze-dried spermatozoa nucleus seems to be cytogenetically intact (Magalhães, 2010), producing normal offspring of murine (Wakayama and Yanagimachi, 1998), leporine (Liu *et al.*, 2004), bovine (Hamano *et al.*, 1999), and swine (Nakai *et al.*, 2003) species.

It is worth noting that all offspring were produced using Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) because the freeze-drying process makes the sperm cells

immotile and incapable of fertilizing oocytes both *in vivo* and *in vitro* (Liu *et al.*, 2004).

Sperm quality evaluation

The objective of the sperm evaluation is to investigate the sperm fecundating capacity in relation to the number of cells of normal structure and function (Watson, 1990). Currently, there is no isolated test or assessment that may predict the fecundating capacity of ejaculates (Magalhães, 2010; Peña, 1997).

Sperm membranes

The following sperm membranes are affected by cryopreservation: plasma membrane, outer acrosomal membrane, and mitochondrial membranes. The plasma membrane surrounds the whole spermatozoon and the evaluation of sperm membrane integrity is an important marker for the success of cryopreservation, since membranes are extremely sensitive to cryoinjuries.

Under cryopreservation stress, membranes may reorganize themselves thus allowing the formation of vulnerable sites leading to excessive permeability or even membrane collapse. In the sperm membrane such stress is related to the lipid transitional phase changes, in which the functional state of the membrane is altered (Holt *et al.*, 1992).

Fluorescent probes

To assess the membrane integrity, several staining methods have been developed. Staining with propidium iodide (PI) became a popular method because it is technically simple, stable and efficient in assessing plasma membrane integrity, alone or in association with other probes (Arruda *et al.*, 2007). PI specifically binds to DNA, but it does not cross the intact plasma membrane. Thus, the nucleus of ruptured plasma membrane cells present red color whereas intact membrane presents fluorescent green color (Garner *et al.*, 1986; Celeghini *et al.*, 2004).

Pisum sativum agglutinin (PSA) specifically binds to the mannosidase (Cross *et al.*, 1986), and when used together with fluorescein isothiocyanate (FITC) it stains acrosome-reacted sperm in yellowish-green (Graham *et al.*, 1990; Celeghini *et al.*, 2004).

It is important to assess structural integrity of the sperm cell because the functionality of gametes is directly related to the plasma membrane integrity, which means that for every structural injury there is a corresponding functional change (Zuccari, 1998).

Nucleic proteins associated with DNA constitute the sperm chromatin, which is more compact than the chromatin of somatic cells (Evenson *et al.*, 1980). The high condensation of sperm chromatin helps maintaining DNA integrity and protection against



mutation or environmental stress, thus enabling normal oocyte fertilization and chromatin decondensation. Chromatin alterations may affect the decondensation rate, which seems to be a species-specific phenomenon and may be related to the kind of protamin present and the extension of disulphide links (Perreault *et al.*, 1988).

Staining with the Acridine Orange probe (AO) allows the differentiation between double-stranded and single-stranded DNA (Ichimura, 1975). AO molecules permeate intact DNA (yellowish-green staining) or bind to denatured DNA phosphate groups (orange-red staining; Mello, 1982). An important limitation of this technique is the subjectivity of the interpretation of results. Nevertheless, AO is recommended due to its practicality.

Comet assay

Another DNA analysis test is the Comet Assay (CA). In this technique a single cell is analyzed and DNA damage detected and quantified. The CA uses nucleus embedded in agarose and exposed to an electric field (Östling and Johanson, 1984). Singh *et al.* (1988) formulated its alkaline version to detect single-stranded DNA breaks. This version is being used to evaluate sperm cells that underwent cryopreservation (Magalhães, 2010).

The electric current pulls the DNA out of the nucleus so that damaged or loose DNA fragments migrate more than intact ones. Resulting images resemble the shape of a comet and their assessment enables the measurement of the extension of DNA damage (Fairbairn *et al.*, 1995).

Together with other DNA integrity assessments, the Comet Assay may help predict whether a freeze-dried sample shall be used for the embryo production.

Conclusion

Taking into consideration the fact that the cryoinjuries that occur during the freeze-drying process do not cause damage to sperm DNA, domestic cat freeze-dried sperm samples might be used in the IVP of embryos. Nevertheless, there is a need for Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) since spermatozoa are immotile after freeze-drying. The ICSI is already common practice in feline embryo production and thus can be recommended for wild felines.

References

Arruda RP, Andrade AFC, Peres KR, Raphael CF, Celeghini ECC. 2007. Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen eqüino. *Rev Bras Reprod Anim*, 31:8-16.

Cabrera GM, Goodrich Junior RP. 1998. Method of lyophilization of mammalian sperm cells. Available on:

<http://www.freepatentsonline.com/5849473.html>.

Accessed on: May 5th 2008.

Celeghini ECC, Arruda RP, Andrade AFC, Raphael CF, Nascimento J. 2004. Simultaneous evaluation of the plasmatic, acrossomal and mitochondrial membranes in equine spermatozoa. In: 15th International Congress on Animal Reproduction, 2004, Porto Seguro, Brazil. Porto Seguro, BA: ICAR. pp. 511. (abstract).

Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Flora and Fauna (CITES). 1973. Part of the Endangered Species. Act (PL 93-205, 93rd Congress) and in 50 appendices. In: Code of Federal Regulations. Washington, DC: US Government Printing Office. part 23.

Cross NL, Morales P, Overstreet JW, Hanson FW. 1986. Two simple methods for detecting-reacted human sperm. *Gamete Res*, 15:213-226.

Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR. 1980. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science*, 210:1131-1133.

Fairbairn DW, Olive PL, O'Neil KL. 1995. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res*, 339:37-59.

Fiser PS, Fairfull RW. 1986. Combined effects of glycerol concentration, cooling velocity, and osmolality of skim milk diluents on cryopreservation of ram spermatozoa. *Theriogenology*, 25:473-484.

Garner DL, Pinkel DP, Johnson LA, Pace MM. 1986. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. *Biol Reprod*, 34:127-138.

Graham JK, Kunze E, Hammerstedt RH. 1990. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. *Biol Reprod*, 43:55-64.

Hamano K, Li X, Qian XQ, Funauchi K, Furudate M, Minato Y. 1999. Gender preselection in cattle with intracytoplasmically injected, flow cytometrically sorted sperm heads. *Biol Reprod*, 60:1194-1197.

Holt WV, Head MF, North RD. 1992. Freeze-induced membrane damage in ram spermatozoa is manifested after thawing: observations with experimental cryomicroscopy. *Biol Reprod*, 46:1086-1094.

Ichimura S. 1975. Differences in the red fluorescence of Acridine Orange bound to single stranded RNA and DNA. *Biopolymers*, 14:1033-1047.

Liu JL, Kusakabe H, Chang C-C, Suzuki H, Schmidt DW, Julian M, Pfeffer R, Bormann CL, Tian XC, Yanagimachi RE, Yang X. 2004. Freeze-dried sperm fertilization leads to full-term development in rabbits. *Biol Reprod*, 70:1776-1781.

Magalhães LCO. 2010. *Efeito da liofilização sobre o sêmen congelado de cães e gatos* [in Portuguese]. Botucatu, Brasil: Universidade Estadual Paulista. Thesis.

Martins CF. 2006. *Liofilização de espermatozoides bovinos: viabilidade estrutural e funcional* [in Portuguese]. Brasília, Brasil: Universidade de Brasília. Thesis.



- Mello MLS. 1982. Induced metachromasia in bull spermatozoa. *Histochemistry*, 74:387-392.
- Nakai M, Kashiwazaki N, Takizawa A, Hayashi Y, Nakatsukasa E, Fuchimoto D, Noguchi J, Kaneko H, Shino M, Kikuchi K. 2003. Viable piglets generated from porcine oocytes matured in vitro and fertilized by intracytoplasmic sperm head injection. *Biol Reprod*, 68:1003-1008.
- Östling O, Johanson KJ. 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 123:291-298.
- Peña A. 1997. *Supervivencia y fertilidad del semen canino sometido a congelación-descongelación* [in Spanish]. Santiago de Compostela, Spain: Universidad de Santiago de Compostela. Thesis.
- Perreault SD, Barbee RR, Elstein KH, Zucker RM, Keefer CL. 1988. Interspecies differences in the stability of mammalian sperm nuclei assessed in vivo by sperm microinjection and in vivo by flow cytometry. *Biol Reprod*, 39:157-167.
- Saragusty J, Gacitua H, Rozenboim I, Arav A. 2009a. Do physical forces contribute to cryodamage? *Biotechnol Bioeng*, 104:719-728.
- Saragusty J, Hildebrandt TB, Behr B, Knieriem A, Kruse J, Hermes R. 2009b. Successful cryopreservation of Asian elephant (*Elephas maximus*) spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, 115:255-266.
- Siemieniuch M, Dubiel A. 2007. Preservation of tomcat (*Felis catus*) semen in variable temperatures. *Anim Reprod Sci*, 99:135-144.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*, 175:184-191.
- Soares MP, Rossi CAR, Mezzalana A, Cecim M. 2002. Etileno glicol na criopreservação de sêmen canino. *Ciênc Rural*, 32:649-655.
- Wakayama T, Yanagimachi R. 1998. Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Nat Biotechnol*, 16:639-641.
- Watson PF. 1981. The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: Morris GJ, Clarke A. (Ed.). *The Effects of Low Temperatures on Biological Membranes*. London: Academic Press. pp. 189-218.
- Watson PF, Morris GJ. 1987. Cold shock injury in animal cells. *Symp Soc Exp Biol*, 41:311-340.
- Watson PF. 1990. Artificial insemination and the preservation of semen. In: Lamming GE. (Ed). *Marshall's Physiology of Reproduction*. 4th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone. v. 2, pp. 747-869.
- White IG. 1993. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reprod Fertil Dev*, 5:639-658.
- Zuccari CESN. 1998. *Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática equina* [in Portuguese]. Botucatu, Brasil: Universidade Estadual Paulista. Thesis.

Trabalho submetido

10) Trabalho submetido

Trabalho submetido para a Revista Veterinária e Zootecnia

10.1 Normas para publicação

Diretrizes para Autores

• Artigos Científicos

Devem ser estruturados de acordo com os seguintes itens:

1. Página de rosto, com:

- Título do trabalho em português, em inglês e em espanhol, fonte Times New Roman, tamanho 12, com espaçamento simples, em negrito e centralizado, em letra maiúscula. Quando necessário, indicar a entidade financiadora da pesquisa, como primeira chamada de rodapé;
- Em caso de envolvimento de seres humanos ou animais de experimentação, encaminhar o parecer da Comissão de Ética ou equivalente, assinalando, no trabalho, antes das referências, a data de aprovação.

2. Página com resumo, abstract e resumen

1. Tanto o resumo, como o abstract e o resumen devem ser seguidos do título do trabalho, no respectivo idioma, e conter no máximo 400 palavras cada um, com informações referentes à introdução, metodologia, resultados e conclusões. O texto deve ser justificado e digitado em parágrafo único e espaço simples, começando por RESUMO. O abstract, e o resumen devem ser tradução fiel do resumo. Independente da língua em que o artigo for apresentado, deverá conter o resumo em português, inglês e espanhol.
2. Devem conter, no máximo, cinco palavras-chave, keywords, e palabras clave que identifiquem o conteúdo do texto.

3. A estrutura do artigo deverá conter:

Introdução: Deve ser clara, objetiva e relacionada ao problema investigado e à literatura pertinente, bem como aos objetivos da pesquisa. A introdução estabelece os objetivos do trabalho.

Material e Métodos: Deve oferecer informações de reprodutibilidade da pesquisa, de forma clara e concisa, como variáveis, população, amostra, equipamentos e métodos utilizados, inclusive os estatísticos.

Resultados: Apresentação dos resultados obtidos, que devem ser descritos sem interpretações e comparações. Poderá ser sob a **forma de tabelas**, no máximo de cinco, ordenadas em algarismos arábicos e encabeçadas pelo título, de acordo com as normas de apresentação tabular da ABNT/WBR 6023/2000 da

Associação Brasileira de Normas Técnicas, identificadas no texto como Tabela; sob a **forma de figuras**, nos casos de gráficos, fotografias, desenhos, mapas, etc., ordenadas em algarismos arábicos, até no máximo de seis, e citadas no texto como Figura.

Discussão: Deve ser entendida como a interpretação dos resultados, confrontando com a literatura pertinente, apresentada na introdução. Se julgar conveniente, os resultados e a discussão poderão ser apresentados conjuntamente.

Conclusões: É a síntese final, fundamentada nos resultados e na discussão.

Referências: Devem ser apresentadas de acordo com as normas Vancouver (<http://www.icmje.org/>).

Deverão ser editorados em Microsoft Word for Windows, para edição de textos, Excel (qualquer versão) para gráficos, formato JPEG ou GIF (imagem) para fotografias, desenhos e mapas, formato A4 (21,0 x 29,7 cm), em espaço simples, mantendo margens de 2,5 cm, nas laterais, no topo e pé de cada página, fonte Times New Roman, tamanho 12 e numeração consecutiva das páginas em algarismos arábicos, a partir da folha de identificação. Deverão também apresentar numeração nas linhas, reiniciando a contagem a cada nova página. Ilustrações e legendas devem ser apresentadas no decorrer do texto. Não serão fornecidas separatas. Os artigos estarão disponíveis no formato PDF no endereço eletrônico da revista. Para as demais seções da revista são válidas as normas anteriores. Não devem exceder a 15 páginas. Abreviaturas não usuais devem ser empregadas após escritas por extenso na primeira utilização.

• Referências e Citações

As referências devem ser numeradas consecutivamente e listadas na ordem em que são mencionadas no texto. As referências devem ser identificadas no texto, nas tabelas e legendas com números arábicos, entre parênteses, seguindo a mesma sequência. Os títulos das revistas devem ser abreviados de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus* disponível em: <http://www.nlm.nih.gov>.

Exemplos

Citações

O material deve ser mantido em compressas embebidas em solução fisiológica para evitar o ressecamento (5).

Aulisa(1) administrou heparina, por via intramuscular, em cobaias.

Udupa & Prasad (9) utilizaram osteoclasia manual do úmero sem imobilização

Herbsman et al. (7) realizaram osteoclasia manual no fêmur e não imobilizaram.

O rato apresenta níveis mais elevados de heparina que o homem (35,42,51).

O mesmo autor obteve resultados semelhantes, mesmo com metodologias diferentes (22-26).

Referências

Indique somente até seis autores. Em caso de mais autores, usar et al. após o sexto autor.

1. Artigo de revista

Andrade SF, Sakate M. Intoxicação por amitraz: revisão. Vet Not. 2004;10:1-15.

Modolo JR, Stachissini AVM, Gennari SM, Dubey JP, Langoni H, Padovani CV, et al. Frequência de anticorpos anti-Neospora caninum em soros de caprinos do estado de São Paulo e sua relação com o manejo dos animais. Pesq Vet Bras. 2008;28:597-9.

2. Organização como autor

Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. 12nd ed. Washington; 1975.

Universidade Federal de Viçosa. SAEG: sistema de análises estatísticas e genéticas: manual do usuário: versão 7.1. Viçosa; 1997.

3. Livro

Modolo JR, Stachissini AVM, Castro RS, Ravazzolo AP. Planejamento de saúde para o controle da artrite-encefalite caprina. São Paulo: Cultura Acadêmica; 2003.

4. Capítulo de livro

Corrêa MC, Corrêa CNM. Estafilococias em geral. In: Corrêa MC, Corrêa CNM. Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos. 2ª ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1992. p.91-103.

Mendes AA, Saldanha ESPB. A cadeia produtiva da carne de aves no Brasil. In: Mendes AA, Naas IA, Macari M. Produção de frangos de corte. Campinas: FACTA, 2004. p.1-22

5. Artigos apresentados em congressos, reuniões, seminários etc

Malhado CHM, Piccinin A, Gimenez JN, Ramos AA, Gonçalves HC. Modelos polinomiais para descrever a curva de postura de codornas. In: Anais do 3º Congresso Nordeste de Produção Animal; 2004, Campina Grande. Campina Grande: Universidade Federal da Paraíba; 2004. p.1-3

6. Teses, dissertações e outros trabalhos acadêmicos

Mortari AC. Avaliação da técnica de transposição do músculo semitendinoso para reparo do diafragma pélvico: estudo experimental em cães [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2004.

7. Publicações disponíveis na Internet

Vasconcelos JLM. Endometrite subclínica em vacas leiteiras. Campinas; 2004 [cited 2004 Jan 16]. Available from: .

1 **VIABILIDADE DO SÊMEN DE GATO DOMÉSTICO LIOFILIZADO EM MEIO**
2 **SOF**
3 **VIABILITY OF CAT SPERM FREEZE-DRIED IN SYNTHETIC OVIDUCTAL**
4 **FLUID**
5 **VIABILIDAD DEL SEMEN DE GATO DOMÉSTICO LIOFILIZADO EN MEDIO**
6 **SOF**

7
8
9 **RESUMO**

10
11 Este estudo teve como objetivo avaliar a viabilidade sêmen de gato doméstico (*Felis*
12 *silvestris catus*) após a liofilização para a produção de embriões in vitro, de forma a
13 disponibilizar seu uso para a conservação de células espermáticas de gato doméstico por
14 longos períodos. As amostras de sêmen foram colhidas utilizando vagina artificial. O
15 sêmen foi avaliado para motilidade (CASA), vigor, e integridade de DNA. Após a
16 diluição com SOF, o sêmen foi envasado em criotubos de 2,0mL, contendo 1×10^3
17 espermatozoides/mL. As amostras foram liofilizadas a -40°C durante 72 horas e
18 apresentaram 1% de umidade após o final do processo. O armazenamento dos criotubos
19 foi feito a 4°C . As amostras foram ressuspensas em meio SOF para realizar a análise de
20 integridade de DNA. O teste de Laranja de Acridina, ensaio do Cometa, o Teste de
21 avaliação da integridade da cromatina espermática e o TUNEL mostraram que o meio
22 SOF não conferiu proteção adequada contra os danos causados à integridade do DNA
23 espermático durante o processo de liofilização ($P < 0,05$). Em conclusão, o meio SOF,
24 apesar de sua facilidade em manipulação, se mostrou inadequado para a liofilização de
25 sêmen felino ao preservar o material nuclear da célula espermática. Portanto, maiores
26 estudos são necessários para averiguar a eficiência da liofilização de espermatozoides de
27 gato doméstico para a produção de embriões.

28
29 **Palavras chaves:** gato, sêmen, liofilização, SOF.

30
31 **ABSTRACT**
32

1 The objective of the present study was to evaluate the viability of freeze-dried domestic
2 cat (*Felis silvestris catus*) sperm to produce in vitro embryos. This would make the
3 freeze-drying technique available for the long-term preservation of domestic cat
4 spermatozoa. Sperm samples were collected using an artificial vagina and assessed for
5 motility (CASA), vigor, and DNA fragmentation. After adding SOF medium, sperm
6 samples were loaded into 2.0mL cryotubes containing 1×10^3 spermatozoa/mL. Sperm
7 samples were freeze-dried at -40°C for 72 hours and presented 1% moisture at the end of
8 the freeze-drying process. Cryotubes were stocked at 4°C . Samples were rehydrated in
9 SOF medium to perform DNA integrity analysis. Acridine Orange, Comet Assay, Sperm
10 Chromatin Integrity Assessment, and TUNEL revealed that the SOF medium did not
11 provide adequate protection against sperm DNA fragmentation during the freeze-drying
12 process ($P < 0.05$). In conclusion, even though SOF medium is easy to handle, it showed
13 inefficient protection during the freeze-drying process of feline sperm, and did not
14 preserve the sperm cell DNA. Hence, further studies are necessary in order to assess the
15 efficiency of freeze-drying cat sperm to produce embryos.

16

17 **Keywords:** cat, sperm, freeze-dried, SOF

18

19

RESUMEN

20

21 Este estudio tuvo como objetivo evaluar la viabilidad del semen de gato doméstico (*Felis*
22 *silvestris catus*) después de la liofilización para producir embriones in vitro, con el fin de
23 proporcionar su uso para la conservación de los espermatozoides de el gato doméstico
24 durante periodos prolongados. Se recogieron muestras de semen utilizando una vagina
25 artificial. Se evaluó la motilidad (CASA), el vigor y la integridad del ADN. Después de
26 la dilución con SOF, el semen se envasa en viales de 2,0 ml que contenía 1×10^3
27 espermatozoides/mL. Se liofilizaron las muestras a -40°C durante 72 horas y tenían 1 %
28 de humedad al final del proceso. El almacenamiento de los viales se realizó a 4°C . Las
29 muestras se resuspendieron en SOF para llevar a cabo el análisis de la integridad del ADN
30 . La prueba de naranja de acridina, el ensayo de cometa, la prueba para la evaluación de
31 la integridad de la cromatina de esperma y TUNEL mostraron que SOF no confirió

1 protección contra el daño a la integridad de ADN de espermatozoides durante el proceso de
2 liofilización ($P < 0,05$). En conclusión, el SOF, a pesar de su facilidad de manipulación,
3 resultó inadecuado para liofilizar espermatozoides felinos para preservar el material nuclear de la
4 célula de espermatozoides. Por lo tanto, se necesitan más estudios para determinar la eficacia de
5 la liofilización del espermatozoides gato doméstico para producir embriones.

6
7 **Palabras clave:** gato, semen, liofilización, SOF

9 INTRODUÇÃO

11 Há décadas, investimentos têm sido feitos em biotecnologias para a conservação
12 de células espermáticas de modo a possibilitar a perpetuação e multiplicação de um valor
13 genético desejado. Uma das técnicas mais disseminadas de conservação de sêmen é a
14 congelação em nitrogênio líquido para a formação de um banco de germoplasma e
15 conservação de material genético.

16 As técnicas de reprodução assistida se desenvolveram mais rapidamente nas
17 espécies de interesse econômico, sendo que nos carnívoros, só adquiriram maior
18 expressão com o crescimento da relação sentimental entre o homem e o animal. Nesse
19 contexto, a criopreservação de células espermáticas pode vir a ajudar a produção de
20 embrião *in vitro* (PIV) que é uma alternativa para os programas de preservação de
21 felídeos selvagens ameaçados de extinção (1).

22 Vários grupos de pesquisa vêm buscando alternativas mais econômicas e simples
23 que permitam a preservação do genoma animal na sua integridade e que facilitem o
24 armazenamento em temperatura ambiente.

25 Inserindo-se neste propósito, o processo de liofilização espermática (desidratação
26 a vácuo em baixas temperaturas) tem sido o principal objeto de estudo para a conservação
27 do germoplasma masculino, uma vez que apresenta muitos benefícios (2) e é capaz de
28 manter o espermatozoide viável após ressuspensão/hidratação porque seu núcleo é
29 *extremamente condensado para exercer seu papel na fertilização* (3).

30 O objetivo desta investigação foi verificar a viabilidade da técnica de liofilização
31 das células espermáticas dos gatos domésticos através do uso de Laranja de Acridina,

1 Ensaio do Cometa, Teste de avaliação da integridade da cromatina espermática e o
2 TUNEL. Sendo confirmada a viabilidade de tais amostras possibilitará seu
3 armazenamento à temperatura ambiente, por longo período.

5 MATERIAL E MÉTODOS

7 Local

8 O experimento foi realizado no Laboratório de Reprodução de Pequenos Animais
9 e Silvestres (REPAS), e no Centro de Biotecnologia e Diagnóstico em Reprodução
10 Animal (CERAN), ambos pertencentes ao Departamento de Reprodução Animal e
11 Radiologia Veterinária (DRARV) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
12 (FMVZ). Além de ter sido realizadas algumas etapas no Departamento de Microbiologia
13 e Imunologia, e no Departamento de Fisiologia, ambos do Instituto de Biociências de
14 Botucatu (IBB). Todos os laboratórios pertencem à UNESP, Campus de Botucatu,
15 Botucatu, SP, Brasil.

17 Animais

18 Foram utilizados 3 (três) gatos adultos, com idade variando entre 2 e 6 anos de
19 idade, como doadores de sêmen; Duas gatas adultas castradas foram utilizadas como
20 manequim para auxiliar na colheita de sêmen com vagina artificial. Os animais foram
21 alimentados com ração seca e água *ad libitum*.

23 Colheita do sêmen

24 As amostras de sêmen dos gatos foram colhidas utilizando-se uma vagina
25 artificial, a qual foi confeccionada a partir de tetinas de borracha cortadas e adaptadas a
26 tubos plásticos tipo Eppendorf® de 1,5 mL (4). As vaginas artificiais foram mantidas à
27 38° C até o momento da colheita (5). Para a colheita de sêmen, foram utilizadas duas
28 gatas adultas castradas. Estimulada a cobertura, a vagina artificial era posicionada de
29 forma a se encaixar no pênis. Cada gato foi submetido a duas colheitas de sêmen
30 consecutivas, com intervalos de 5 a 10 minutos, utilizando-se tubos diferentes para cada
31 ejaculado. As colheitas foram realizadas com intervalos de no mínimo dois dias e foram

1 realizadas as seguintes análises funcionais: concentração espermática e movimento
2 espermático.

3

4 **Concentração Espermática:**

5 Foi determinada pela contagem das células espermáticas em câmara hematómetrica
6 de Neubauer. Dois (2) µL de sêmen foram adicionados a 98 µL de água destilada
7 (diluição 1:50). Uma alíquota de 10 µL foi depositada em cada lado da câmara. Utilizando
8 microscópio de luz com contraste de fase e aumento de 40x, realizou-se a contagem do
9 número de espermatozoides em cinco quadrantes de cada lado da câmara. O cálculo da
10 concentração espermática foi realizado através da fórmula expressa abaixo.

11

12
$$C = N \times 2,5 \times 10^6$$

13 C = concentração de espermatozoides por mL

14 N = média do número total de células espermáticas contadas em cada lado da câmara de
15 Neubauer.

16

17 **Movimento espermático**

18 O sêmen foi avaliado utilizando o sistema HTR-IVOS-12 (Hamilton Thorn Research –
19 Animal Version 12,0 L, Beverly, MA, EUA) (6). Para esta avaliação, uma gota de sêmen
20 foi colocada em câmara de Makler (HTMA) aquecida e analisada à temperatura de 38°C.
21 Para cada amostra de sêmen, três gotas foram avaliadas e a média dos três melhores
22 campos foi anotada. Durante esta avaliação foram observados os seguintes parâmetros da
23 cinética de movimento:

24

25 MT (%) - motilidade total

26 MP (%) - motilidade progressiva

27 VCL (µm/s) - velocidade espermática ao longo da trajetória real

28 VAP (µm/s) - velocidade espermática ao longo de uma trajetória média

29 VSL (µm/s) - velocidade espermática ao longo de uma linha reta

30 LIN (%) – linearidade, dada pela fórmula VSL/VCL

31 STR (%) - índice retilíneo, dado pela fórmula VSL/VAP

- 1 ALH (μm) - deslocamento lateral da cabeça
2 BCF (Hz) - frequência de batimento flagelar
3 R (%) – rápidos, apresentando VAP > 70 $\mu\text{m/s}$

5 **Liofilização**

6 Após a colheita, as amostras de sêmen foram centrifugadas a 250xg por 8 minutos,
7 o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuscitado em meio SOF (Fluido Sintético de
8 Oviduto ou *Synthetic Oviductal Fluid*) e ajustados numa concentração final de 1×10^3
9 espermatozoides/ mL. Em seguida as amostras foram acondicionadas em criotubos de 2,0
10 mL com um volume total de 1,0 mL para facilitar o processo de liofilização e a
11 individualização das células espermáticas após a ressuspensão da amostra liofilizada.

12 As amostras foram levadas ao liofilizador (Edwards do Brasil) onde
13 permaneceram sob a temperatura de -40°C por 72 horas, período suficiente para obter
14 uma amostra estável com 1% de umidade.

16 **Laranja de Acridina**

17 O sêmen liofilizado foi ressuscitado em 1 mL de SOF e uma gota foi colocada
18 sobre uma lâmina, e realizado esfregaço. Para o sêmen fresco foi coletado uma gota e
19 realizado o esfregaço também. O esfregaço foi fixado em Solução Carnoy (etanol-ácido
20 acético 3:1) por 1 minuto, lavado em etanol 70% por 3 minutos e colocado 4mL da
21 solução corante. Passados 5 minutos a lâmina foi lavada em água destilada e aguardou-se
22 total secagem da lâmina (7).

23 O esfregaço foi analisado em microscópio de epifluorescência (NIKON –
24 Episcopic Fluorescence Attachment “EFA” HalogenLamp Set) utilizando objetiva de
25 100x, sendo que as células consideradas normais (cromatina íntegra) foram aquelas que
26 emitiram fluorescência verde. Já as células que emitiram fluorescência vermelha, laranja
27 e/ou amarela distribuídas no interior da cabeça do espermatozóide foram consideradas
28 anormais com desnaturação total ou parcial da cromatina.

30 **Ensaio do cometa**

1 O Teste do Cometa foi realizado para verificar a ocorrência de dano ao DNA, mas
2 também para validar e/ou parear o resultado com aquele obtido pelo teste de Laranja de
3 Acridina (LA). Foi empregada a metodologia descrita por Singh et al. (8) com
4 modificações. Todas as etapas foram realizadas ao abrigo da luz e sob condições
5 alcalinas.

6 Os espermatozoides liofilizados foram ressuspensos em seu meio original, e o
7 sêmen fresco foi utilizado *in natura*. Após homogeneização, 5µl dessas amostras foram
8 misturados a 100µl de agarose de baixo ponto de fusão 0,5% (Sigma-Aldrich, St. Louis,
9 MO, USA) e distribuídos sobre lâminas de microscopia pré-revestidas com agarose 1,5%
10 de ponto de fusão normal (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), cobrindo-as com uma
11 laminula de 24x60mm.

12 Depois de 5 minutos a 4°C ocorreu a solidificação da agarose, e removeu-se as
13 laminulas. As lâminas foram imersas em solução de lise [2,5 M NaCl (Merck, Darmstadt,
14 Germany), 100 mM EDTA (Merck, Darmstadt, Germany), 10 mM Tris (Amresco, Sólón,
15 Ohio), 1% N-Lauroyl Sarcosine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), pH 10,0;
16 adicionada de 1% de Triton X – 100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 10% de
17 DMSO (Merck, Darmstadt, Germany), e Proteinase K (Merck, Darmstadt, Germany)] , a
18 4°C por 24 horas, para que se destituíssem os componentes de membrana das células.

19 Após a lise, as lâminas foram lavadas por 5 minutos com PBS livre de Ca^{2+} e
20 Mg^{2+} (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), e levadas para cuba de eletroforese, imersas
21 em solução eletroforética [400 mM NaOH (Merck, Darmstadt, Germany) e 1 mM EDTA
22 (Merck, Darmstadt, Germany), pH 10,0] e deixadas em repouso por 30 minutos para
23 desnaturação do DNA. A fonte de eletroforese foi ajustada para voltagem 25 V, 300mA e
24 tempo de corrida de 30 minutos. Iniciada a corrida a miliamperagem foi rigorosamente
25 controlada adicionando ou removendo o tampão de eletroforese da cuba.

26 As lâminas foram neutralizadas com solução 0,4 M Tris (Amresco, Sólón, Ohio),
27 pH 7,5 por 15 minutos, imersas em etanol 95% (Merck, Darmstadt, Germany) para
28 fixação em uma cuba de vidro.

29 Quando secas as lâminas foram armazenadas em caixas plásticas e mantidas sobre
30 refrigeração à 4°C. As amostras foram coradas com 50 µl de brometo de etídio (Sigma-
31 Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluído (20µg/ml) e a análise foi feita em microscópio de

1 fluorescência (Axioplan I-Zeiss, Wolfville, N.S., Canadá) a um aumento de 400x em
2 analisador de imagens (Comet Assay II – Perceptive Instruments, Suffolk, Inglaterra).

3 Para cada grupo, as amostras foram avaliadas em duplicata e contadas 50 células,
4 utilizando os parâmetros de *tail intensity* (intensidade do DNA contido na cauda do
5 cometa).

6 Para avaliar a corrida eletroforética foram realizados controles positivos para cada
7 cuba com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 100 µM
8 a 4°C, para indução de dano ao DNA. O material controle era sangue de cão sadio,
9 colhido com anticoagulante, acondicionado em gelo e ao abrigo da luz. Ambos os
10 controles foram processados e lidos da mesma maneira descrita para as células
11 espermáticas.

12

13 **Teste de avaliação da integridade da cromatina espermática**

14 Uma amostra de 100 µL de sêmen liofilizado foi diluída, em solução tampão
15 (0,186g de EDTA dissódico, 0,790g de Tris-HCl, 4,380g NaCl em 500 mL água
16 deionizada, pH 7.4) na concentração de 1×10^6 espermatozoides/mL. Foi adicionado 400
17 µL de solução detergente ácida (2,19 g NaCl, HCl 1,0 mL de 2N solução, 0,25 mL
18 Triton-X, em qsp. 250 mL de água deionizada, pH 1,8). A mesma foi incubada por 30
19 segundos e então acrescido 1mL de solução corante de laranja de acridina (AO; 3,8869 g
20 de ácido cítrico mono-hidratado, 8,9429 g Na₂HPO₄, 4,3850g NaCl, 0,1700g de EDTA
21 dissódico, 4 µg/mL de solução laranja de acridina – 1 mg/mL, em qsp. 500 mL de água,
22 pH 6,0), a qual foi incubada por mais 30 segundo ao abrigo da luz. O índice de
23 fragmentação de DNA (IDF) foi gerado a partir da análise de 10.000 células marcadas
24 com laranja de acridina. Os dados gerados foram analisados pelo software WinList 6.0
25 (Verify software house). O IDF é a proporção expressa em porcentagem do DNA do
26 espermatozoide, do DNA fragmentado (fluorescência vermelha) dividida pela
27 fluorescência total, ou seja, a soma do DNA fragmentado (fluorescência vermelha) com o
28 DNA não fragmentado (fluorescência verde). O mesmo procedimento foi realizado para o
29 sêmen fresco.

30

TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)- mediated dUTP nick end labeling)

Um total de 200 µL de sêmen (1-2 x 10⁶ cels/ml) (líoilizado e fresco) foi adicionado a 200 µL de paraformaldeído a 4% em PBS, em um pH 7,4 e incubado por 1 hora em temperatura ambiente. Os espermatozoides foram centrifugados a 300 x g por 5 minutos e lavados duas vezes em 200 µL de PBS. Os espermatozoides fixados foram então permeabilizados com 0,1 % triton X- 100 em 0,1 % citrato de sódio (100 µL) e colocados em gelo por 2 minutos. Após duas lavagens as células foram novamente incubadas por 1 hora à 37°C com mistura de reação para TUNEL (50 µL/poço) que continha a reação de marcação (AlexaFlour488) e enzima desoxinucleotidil transferase terminal (TdT) no escuro. A mistura para reação de TUNEL (APO-BrdUTM TUNEL Assay Kit - A23210, Molecular Probes) foi preparada imediatamente e mantida em gelo até o uso. Finalmente, as amostras foram lavadas duas vezes, resuspendidas em 500 µL PBS e analisadas por citometria de fluxo.

Análise estatística

Para a análise estatística, os dados foram submetidos a ANOVA utilizando-se o PROC GLM do SAS (SAS, Inst. Inc., Cary, NC, EUA). Fontes de variação no modelo incluindo tratamento e animal foram considerados como efeitos fixo e aleatório, respectivamente. Se a ANOVA foi significativa as médias foram separadas utilizando o Least Square Difference. Os dados são apresentados como média dos quadrados mínimos e erro padrão. Para todas as análises foi adotado o nível de significância menor ou igual a 5%.

Resultados

TABELA 1: Resultado da avaliação da integridade de DNA de células espermáticas de gato provenientes de sêmen fresco e líoilizado utilizando a sonda fluorescente de Laranja de Acridina. Botucatu, 2013.

	fresco	líoilizado
lesão de DNA	1,5±0,8 ^a	24,8±0,8 ^b

* Médias seguidas de letras diferentes numa mesma linha diferem entre si (P≤0,05).

1 TABELA 2: Resultado da avaliação da integridade de DNA de células espermáticas de
 2 gato considerando sêmen fresco e pós-liofilização utilizando o Ensaio do Cometa.
 3 Botucatu, 2013.

	fresco	liofilizado
lesão de DNA	0,3±0,4 ^a	5,21±0,4 ^b

4 * Médias seguidas de letras diferentes numa mesma linha diferem entre si (P≤0,05).

5

6 TABELA 3: Resultado da avaliação realizada pelo teste de avaliação da integridade da
 7 cromatina espermática e TUNEL para amostras de sêmen fresco e liofilizado. Botucatu,
 8 2013.

	fresco	liofilizado
%Gate	2,5±0,5 ^a	37,6±0,5 ^c
TUNEL	2,3±1,0 ^a	92,1±1,0 ^c

9 * Médias seguidas de letras diferentes numa mesma linha diferem entre si (P≤0,05).

10

11 Todas as provas de avaliação de fragmentação de DNA identificaram diferença
 12 significativa (P<0,05) entre as lesões de DNA das amostras de sêmen fresco e de sêmen
 13 liofilizado. O sêmen liofilizado apresentou maior fragmentação de DNA.

14 O TUNEL foi capaz de identificar maior lesão de DNA que os demais testes.

15

16 **Discussão**

17 Os programas de conservação *in situ* e *ex situ* para essas espécies podem ser
 18 beneficiadas com a utilização das técnicas de reprodução assistida, incluindo;
 19 inseminação artificial (IA), transferência de embrião (TE), fertilização *in vitro* (FIV),
 20 micromanipulação de gametas/ embriões, sexagem espermática e clonagem (9).

21 Mais recentemente utilizando sêmen liofilizado (10, 11) pode vir a ser mais um
 22 auxílio para os veterinários e criadores que busquem o melhoramento genético de seus
 23 animais.

24 A liofilização aparece como um recurso para eliminar a necessidade do uso de
 25 nitrogênio líquido tanto para o transporte quanto para o armazenamento de amostras de
 26 sêmen. Acaba também com a necessidade de reposição de nitrogênio líquido nos botijões

1 criobiológicos uma vez que o sêmen liofilizado pode ser armazenado tanto em
2 refrigerador convencional (4°C) como em temperatura ambiente (12) em frascos de 2,5
3 mL (criotubos) ou em ampolas de vidro (13). Como as amostras deste experimento
4 apresentavam 1% de umidade total optou-se por mantê-las em refrigerador convencional
5 (4 °C) de forma a mantê-las estáveis.

6 O meio SOF foi testado nesse experimento como meio diluidor para a liofilização
7 de células espermáticas de gato doméstico por ser um meio quimicamente definido (14)
8 sendo assim facilitaria o posterior trâmite comercial internacional do produto final, já que
9 o sêmen liofilizado não necessita de nitrogênio líquido nem gelo seco para seu transporte,
10 podendo ser transportado em temperatura ambiente em curto período de tempo (15).

11 O meio analisado neste experimento não havia sido testado como diluidor de
12 sêmen para ser utilizado em técnicas de criopreservação por não ter qualquer componente
13 crioprotetor anteriormente estudado (como por exemplo, glicerol, etileno glicol, gema de
14 ovo, ou leite desnatado). Como alguns estudos mostram que há indícios de que um núcleo
15 espermático intacto possa ser a única condição necessária para um desenvolvimento
16 embrionário bem sucedido, mesmo após a motilidade e integridade de membrana dos
17 espermatozóides estarem comprometidas (16) optou-se por utilizar um meio
18 quimicamente definido e analisar se os danos causados durante o processo de liofilização
19 chegariam a desestabilizar a cromatina espermática. Há então a necessidade ainda de
20 identificar os componentes críticos que estão envolvidos na estabilização do núcleo do
21 espermatozóide (17).

22 O tempo de liofilização pode ter sido uma das causas para o grande índice de
23 fragmentação de DNA, já que as membranas espermáticas foram lesadas durante o
24 processo (18) e as nucleases endógenas dos espermatozóides podem ter sido liberadas e
25 ativadas por cátions bivalentes como o Mg^{2+} e o Ca^{2+} presentes no meio em questão (19),
26 e as amostras só se encontram estáveis no final da liofilização.

27 Liu *et al.* (20) relataram que cerca de 16% dos espermatozóides apresentaram
28 caudas quebradas ou descoladas da cabeça (espermatozóides decapitados). Em nosso
29 estudo, a decapitação apenas foi observada numa porcentagem baixa (3%).

30 Os espermatozóides, devido às diversas alterações causadas durante o processo de
31 liofilização incluindo às membranas plasmáticas e acrossomais, se tornam imóveis

1 necessitando o uso de ICSI para que ocorra a fecundação e promovam o desenvolvimento
2 embrionário (12). Neste experimento isso não foi diferente, uma vez que observou-se a
3 imobilidade de 100% das células espermáticas estudadas. Sendo assim, não foi utilizado o
4 método CASA pós-liofilização para análise das amostras (para o método CASA há a
5 necessidade de células espermáticas com movimento de cauda). Mesmo assim, não foi
6 descartado o uso de tal método para a análise do sêmen antes da liofilização de forma a
7 padronizar a qualidade de sêmen da espécie em estudo e apenas incluir sêmen de boa
8 qualidade em nosso experimento.

9 A despeito dos espermatozóides se apresentarem imóveis após a liofilização,
10 acredita-se que seja possível a utilização desse material para a produção de embriões uma
11 vez que já foi provado que não há necessidade que os espermatozóides estejam vivos no
12 sentido convencional para que proporcionem um desenvolvimento embrionário normal
13 (12, 21). O fato dos espermatozóides estarem imóveis pode ainda aumentar o índice de
14 sucesso das ICSIs. Isso ocorre provavelmente devido a desintegração mais rápida da
15 membrana plasmática e, portanto uma união mais precoce do núcleo do espermatozóide
16 com o citoplasma do oócito (11). Como os espermatozóides não apresentam motilidade,
17 não conseguem realizar o modelo clássico de fertilização e então a ICSI se torna um fator
18 limitante para o sucesso da produção de embriões de sêmen liofilizado.

19 A concentração espermática normalmente utilizada para a liofilização não difere
20 daquela recomendada para a congelação, ou seja, de 15 a 200×10^6 espermatozóides/mL
21 dependendo da espécie trabalhada (12, 22, 23, 24).

22 Neste experimento optou-se pela concentração final de 1×10^3 espermatozóides/mL
23 uma vez que os espermatozóides seriam utilizados para ICSI onde apenas um
24 espermatozóide é utilizado por procedimento e uma concentração muito elevada de
25 células somente atrapalharia a manipulação. Além disso, verificou-se que uma
26 concentração $\geq 2 \times 10^3$ espermatozóides/mL resultou em aglutinação de células
27 espermáticas impossibilitando o isolamento de células e, portanto, a sua utilização.

28 A concentração de 1×10^3 espermatozóides/mL ainda apresentou certa aglutinação
29 de células, aglutinação esta que foi facilmente desfeita com a pipetagem da amostra após
30 suspensão utilizando pipeta do tipo Pasteur.

1 Apesar de alguns autores (25, 26) mencionarem o fato de algumas células
2 espermáticas conseguirem resistir às baixas temperaturas de gases na forma líquida sem
3 qualquer pré-tratamento com meio protetor, as tentativas de descongelação dessas células
4 para possível fertilização não obtiveram grande sucesso (27), talvez porque na época
5 ainda não se possuía conhecimento e tecnologia suficiente para realizar a ICSI destas
6 amostras. Em nosso experimento os espermatozóides imersos em SOF não apresentaram
7 qualquer possibilidade de escaparem ileso após o processo de liofilização das amostras.
8 Katayose *et al.* (28) demonstrou que espermatozóides de camundongo imersos em
9 nitrogênio líquido sem o uso de crioprotetores conseguiram levar ao desenvolvimento
10 normal de embriões após ICSI de suas cabeças, sendo assim podemos especular que as
11 células espermáticas liofilizadas em nosso experimento podem levar a produção de
12 embriões, desde que a fragmentação de DNA presente não cause um bloqueio no
13 desenvolvimento embrionário.

14 Sabe-se que mesmo ocorrendo fragmentação do DNA do espermatozóide, na
15 fertilização ocorre uma troca de cromátides que segue um padrão espécie-específico
16 (oócito-específico) dependendo do sistema de reparo nos oócitos fertilizados com
17 espermatozóide (29). No entanto, tal reparo pode levar à incidência de aberrações
18 cromossômicas (30).

19 Uma quantidade pequena de quebras de uma fita do DNA pode ser reparada pelo
20 oócito, mas as quebras de dupla fita de DNA são irreversíveis (31).

21 É importante verificar os possíveis danos causados ao DNA já que estes estão
22 associados a um desenvolvimento embrionário ruim e baixos índices de prenhez através
23 de fertilização *in vitro* (FIV)(32). A cromatina espermática é extremamente compactada
24 devido a associações entre o DNA e as proteínas nucleares do espermatozóide,
25 predominantemente protaminas (33). Qualquer deficiência em protaminas (absoluta ou
26 relativa) pode levar a uma compactação irregular da cromatina e então levar a uma
27 suscetibilidade maior de danos ao DNA (34).

28 Várias técnicas têm sido empregadas para avaliar a integridade do DNA de células
29 espermáticas após a utilização de técnicas de criopreservação. Optou-se primeiramente
30 por usar o teste de Laranja de Acridina (LA) por ser simples e rápido de ser realizado.

1 O teste de LA já foi comparado a outros testes para a detecção de lesão de DNA
2 por outros autores (35, 36) e todos foram unânimes em afirmar que a sensibilidade do
3 teste é inferior aos demais, mas isso não tira seu mérito devido a sua praticidade.

4 O LA confirmou a fragmentação de DNA das células espermáticas após o
5 processo de liofilização. Apesar de sua facilidade em realização, o teste de LA apresenta
6 falhas devido à sua subjetividade de leitura, desvanecimento rápido da fluorescência e a
7 montagem de lâminas heterogêneas (37). Martins (2) também observou discrepância de
8 resultados ao comparar o teste de LA com, mostrando que o LA não é tão preciso na a
9 análise de cromatina espermática.

10 Com gestações levadas a termo obtidas pelo método de ICSI (21, 38), mostrou-se
11 ser possível o uso de espermatozoides imoveis para a produção *in vitro* (PIV) de embriões
12 de gatos domésticos. No entanto, serão necessários maiores estudos abordando as
13 alterações causadas às células espermáticas durante a liofilização, pois pode ter ocorrido
14 alteração no fator de ativação de oócito proveniente do espermatozoide (SOAF)(39) e
15 assim comprometer os índices de produção de embriões.

16

17 **Conclusões**

18 Com base nos resultados, é possível sugerir que:

- 19 1. o meio SOF foi não eficiente no que diz respeito a conservação do material no núcleo
20 espermático durante o processo de liofilização.
- 21 2. estudos ainda são necessários para avaliar se os resultados obtidos nos testes de
22 detecção de fragmentação de DNA interferirão na produção embrionária a partir de
23 espermatozoides liofilizados.

24

25 **Referências**

- 26 (1) LOSKUTOFF, N.M.; BARTELS, P.; MEINTJES, M.; GODKE, R.A.; SCHIEWE,
27 M.C. Assisted reproductive technology in nondomestic ungulates: a model approach to
28 preserving and managing genetic diversity. *Theriogenology*. v.443, p.3–12, 1995.
- 29 (2) MARTINS, C.F. *Liofilização de espermatozoides bovinos: viabilidade estrutural e*
30 *funcional*. 2006. 111f. Tese (Doutorado) – Departamento de Biologia Celular, Instituto de
31 Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília.
- 32 (3) GOSDEN, R. Cryopreservation: a cold look at technology for fertility preservation.
33 *Fertility and Sterility*. v. 96, p. 264-268, 2011.

- 1 (4) SOJKA, N.J.; JENNINGS, L.L.; HAMNER, C.E. Artificial insemination in the cat
2 (*Felis catus*). *Lab. Anim. Care*. v.20, p.198–204, 1970.
- 3 (5) VILLAVERDE, A.I.S.B. *Comparação entre dois métodos de inseminação artificial*
4 *utilizando sêmen congelado em gatos domésticos (Felis catus)*. 2007. 117f. Dissertação
5 (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual
6 Paulista, Botucatu.
- 7 (6) VILLAVERDE, A.I.S.B.; MELO, C.M.; MARTIN, I.; FERREIRA, T.H.; PAPA,
8 F.O.; TACONELI, C.A.; LOPES, M.D. Comparison of efficiency between two artificial
9 insemination methods using frozen–thawed semen in domestic cat (*Felis catus*)
10 Artificial insemination in domestic cats. *Anim. Reprod. Sci.* v.114, p.434–442, 2009.
- 11 (7) NAVES, C.S.; BELETTI, M.E.; DUARTE, M.B.; VIEIRA, R.C.; DINIZ, E.G.;
12 JACOMINI, J.O.; Avaliação da cromatina espermática em eqüinos com azul de toluidina
13 e acridine orange. *Bioscience Journal*. v.20, n.3, p.117–124, 2004.
- 14 (8) SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique
15 for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.*, v. 175,
16 p. 184–191, 1988.
- 17 (9) VILLAVERDE, A.I.S.B.; LOPES, M.D. Inseminação artificial em gatos domésticos
18 utilizando sêmen criopreservado. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.31, n.1, p.77–83, 2007.
- 19 (10) MARTINS, C.F. *Liofilização de espermatozoides bovinos: viabilidade estrutural e*
20 *funcional*. 2006. 111f. Tese (Doutorado) – Departamento de Biologia Celular, Instituto de
21 Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília.
- 22 (11) WAKAYAMA, T.; YANAGIMACHI, R. Development of normal mice from
23 oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Nat. Biotechnol.*, v.16, p.639–641, 1998.
- 24 (12) KAWASE, Y.; ARAYA, H.; KAMADA, N.; JISHAGE, K-I.; SUZUKI, H.
25 Possibility of long-term preservation of freeze-dried mouse spermatozoa. *Biology of*
26 *reproduction*. V.72, 568–573, 2005.
- 27 (13) KANEKO, T. New possibilities of sperm freeze-drying. *J. Fert. In Vitro*. v.2 (5),
28 2012.
- 29 (14) ARAUJO, M.C.P.M. DE; ARAÚJO, C.H.M. DE; ROCHA, M.G.; MARTINS, W.
30 DE P.; DOS REIS, R.M.; FERRIANI, R.A.; NAVARRO, P.A. DE A.S. Morfologia do
31 primeiro corpúsculo polar e taxas de fertilização, clivagem e qualidade embrionária. *Rev.*
32 *Bras. Ginecol. Obstet.*, vol30, p. 360–365, 2008.
- 33 (15) KANEKO, T.; NAKAGATA, N. Relation between storage temperature and
34 fertilizing ability of freeze-dried mouse spermatozoa. *Comp. Med.* v.55, p.140–144, 2005.
- 35 (16) KUSAKABE, H.; SZCZYGIEL, M.A.; WHITTINGHAM, D.G.;
36 YANAGIMACHI, R.; Maintenance of genetic integrity in frozen and freeze-dried mouse
37 spermatozoa. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 98, p. 13501–13506,
38 2001.

- 1 (17) BHOWMICK, S.; ZFU, L.; MCGINNIS, L.; LAWITTS, J.; NATH, B.D.; TONER,
2 M.; BIGGERS, J. Desiccation tolerance of spermatozoa dried at ambient temperature:
3 production of fetal mice. *Biol. Reprod.*, v. 68, p. 1779-1786, 2003.
- 4 (18) MAGALHÃES L.C.D. *Efeito da liofilização sobre o sêmen congelado de cães e*
5 *gatos*. 2010. 102f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e
6 Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- 7 (19) SOTOLONGO, B.; HUANG, T.T.F.; ISENBERGER, E.; WARD, W.S. An
8 endogenous nuclease in hamster, mouse, and human spermatozoa cleaves DNA into loop-
9 sized fragments. *J. Androl.* v.26, p.272–280, 2005.
- 10 (20) LIU, J.-L.; KUSAKABE, H.; CHANG, C.-C.; SUZUKI, H.; SCHMIDT, D.W.;
11 JULIAN, M.; PFEFFER, R.; BORMANN, C.L.; TIAN, X.C.; YANAGIMACHI, R.E.;
12 YANG, X. Freeze-dried sperm fertilization leads to full-term development in rabbits.
13 *Biol Reprod.*, v.70, p.1776–1781, 2004.
- 14 (21) GOTO, K.; KINOSHITA, A.; TAKUMA, Y.; OGAWA, K. Fertilization of bovine
15 oocytes by the injection of immobilized, killed spermatozoa. *Vet. Rec.*, v. 127, p. 517-
16 520, 1990.
- 17 (22) FELDMAN, E.C.; NELSON, R.W. Canine and feline endocrinology and
18 reproduction. 2.ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1996. 785p.
- 19 (23) CRESPILO, A.M.; PAPA, F.O.; ALBERTI, K.; SIQUEIRA FILHO, E.R.;
20 MARTINS JR., A.; NOVAES, J.L.C.; DELL'AQUA, J.A. Eficiência comparativa entre
21 dois diluidores para congelamento de sêmen bovino sobre os padrões de motilidade e
22 integridade de membrana plasmática. *Ars Veterinaria*. v. 22, p. 229-235, 2006.
- 23 (24) NEILD, D.M.; GADELLA, B.M.; CHAVES, M.G.; MIRAGAYA, M.H.;
24 COLENBRANDER, B.; AGÜERO, A.; Membrane changes during different stages of
25 freeze-thaw protocol for equine semen cryopreservation. *Theriogenology*, v. 59, p. 1693-
26 1705, 2003.
- 27 (25) POLGE, C. Low-temperature storage of mammalian spermatozoa. *Proceedings of*
28 *the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, v. 147, p. 498-508, 1957.
- 29 (26) JAHNEL, F. *Klin. Wchnschr.*, v. 17, p.408-415, 1938.
- 30 (27) HOAGLAND, H.; PINCUS, G. *J. Gen. Physiol.* v. 25, 337, 1942.
- 31 (28) KATAYOSE, H.; MATSUDA, J.; YANAGIMASHI, R. The ability of dehydrated
32 hamster and human sperm nuclei to develop into pronuclei. *Biol. Reprod.* V. 47, p. 277-
33 284, 1992.
- 34 (29) TATENO, H.; KAMIGUCHI, Y.; SHIMADA, M.; MIKAMO, K. Difference in
35 types of radiation-induced structural chromosome aberrations and their incidences
36 between Chinese and Syrian hamster spermatozoa. *Mutat. Res.* v.350, p.339–348, 1996.
- 37 (30) KAMIGUCHI, Y.; TATENO, H.; IIZAWA, Y.; MIKAMO, K. Chromosome
38 analysis of human spermatozoa exposed to antineoplastic agents in vitro. *Mutat. Res.*
39 v.326, p.185–192, 1995.
- 40 (31) AHMADI, A.; NG, S.C. Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *J. Exp.*
41 *Zool.*, v. 284, p. 696-704, 1999.

- 1 (32) FERNÁNDEZ-GONZALEZ, R.; MOREIRA, P.N.; PÉREZ-CRESPO, M.;
2 SÁNCHEZ-MARTÍN, M.; RAMIREZ, M.A.; PERICUESTA, E.; BILBAO, A.;
3 BERNEJO-ALVAREZ, P.; DE DIOS HORCADE, J.; DE FONSECA, F.R.;
4 GUTIÉRREZ-ADÁN, A. Long-term effects of mouse intracytoplasmic sperm injection
5 with DNA-fragmented sperm on health and behavior of adult offspring. *Biol. Reprod.*, v.
6 78, p. 761-772, 2008.
- 7 (33) WARD, W.S.; COFFEY, D.S. DNA packaging and organization in mammalian
8 spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol. Reprod.*, v. 44, p. 569-574, 1991.
- 9 (34) AOKI, V.W.; MOSKOVTSSEV, S.I.; WILLIS, J.; LIU, L.; MULLEN, J.B.;
10 CARREL, D.T. DNA integrity is compromised in protamine-deficient human sperm. *J.*
11 *Androl.*, v. 26, p. 741-748, 2005.
- 12 (35) ROCHA, H.L.O.G.; BELETTI, M.E.; MARCOLINI, T.T.; AMORIM, D.A.Z.; Uso
13 de laranja de acridina e azul de toluidina na avaliação da fertilidade masculina. *Bioscience*
14 *J.*, v. 18, p. 65-77, 2002.
- 15 (36) MACHADO, E.R.; KAMIMURA, C.F.; BELETTI, M.E.; JACOMINI, J.O.
16 Diagnóstico de alterações na compactação da cromatina em espermatozoides de suíno
17 através de azul de toluidina e alaranjado de acridina. *Rev. Bras. Reprod. An.*, v. 27, p.
18 381-382, 2003.
- 19 (37) EVENSON, D. P.; DARZYNKEWICZ, Z.; MELAMED, M. R. Relation of
20 mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science*, v. 210, p. 1131-1133,
21 1980.
- 22 (38) PALERMO, G; JORIS, H; DEVROEY, P.; VAN STEIRTEGHEM, A.C. Induction
23 of acrosome reaction in human spermatozoa used for subzonal insemination. *Human*
24 *Reproduction*, v. 7, p. 248-254, 1992.
- 25 (39) HIRABAYASHI, M.; KATO, M.; ITO, J.; HOCHI, S. Viable rat offspring derived
26 from oocytes intracytoplasmically injected with freeze-dried sperm heads. *Zygote*, v. 13,
27 p. 79-85, 2005.

Anexos

Anexo 1. Valores do ajuste estabelecido para a avaliação do sêmen de gato no sistema CASA (Computer-Assisted Semen Analyzer, HTR-IVOS 10 Analyzer, Hamilton Thorne Research, Beverly, MA, USA).

VARIÁVEL		VALOR
Quadros por segundo		60 Hz
Número de quadros		30
Contraste mínimo		40
Tamanho celular mínimo		4 pixels
Default	Tamanho celular	5 pixels
	Intensidade celular	100
Células progressivas	VAP	70 $\mu\text{m/s}$
	STR	80%
Células lentas	VAP - Cutoff	30 $\mu\text{m/s}$
	VSL - Cutoff	20 $\mu\text{m/s}$

Anexo 2. Preparo das soluções para o teste de Laranja de Acridina (AO)

Solução estoque

1g de AO diluído em 1000mL de água destilada

Solução corante

10mL da solução estoque

40mL de ácido cítrico a 0,1M

2,5mL de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a 0,3M

pH final = 2,5 concentração de 0,19mg/mL

Anexo 3. Composição do meio TALP-FIV

REAGENTES	CÓDIGO	CONCENTRAÇÃO
NaCl	Sigma S5886	114mM
KCl	Sigma P5405	3mM
NaHCO ₃	Sigma S5761	25mM
MgCl ₂ x6H ₂ O	Sigma M2393	0,5mM
CaCl ₂ x2H ₂ O	Sigma C4901	2mM
NaH ₂ PO ₄	Sigma S5011	0,3mM
CH ₃ CH(OH)COONa	Sigma L4263	12mM

Anexo 4. Composição do meio TALP-sêmen

REAGENTES	CÓDIGO	CONCENTRAÇÃO
NaCl	Sigma S5886	114mM
KCl	Sigma P5405	3mM
NaHCO ₃	Sigma S5761	25mM
MgCl ₂ x6H ₂ O	Sigma M2393	0,5mM
CaCl ₂ x2H ₂ O	Sigma C4901	2mM
NaH ₂ PO ₄	Sigma S5011	0,3mM
CH ₃ CH(OH)COONa	Sigma L4263	12mM
C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S	Sigma H6147	10mM

Anexo 5. Composição do meio SOFaa

REAGENTES	CÓDIGO	CONCENTRAÇÃO
NaCl	Sigma S5886	107,6mM
KCl	Sigma P5405	7,16mM
NaHCO ₃	Sigma S5761	25mM
MgSO ₄ x7H ₂ O	Sigma M1880	0,74mM
CaCl ₂ x2H ₂ O	Sigma C7902	1,78mM
KH ₂ PO ₄	Sigma P5655	1,2mM
HOC(COONa)(CH ₂ COONa) ₂ x2H ₂ O	Sigma S4641	0,34mM
CH ₃ CH(OH)COONa	Sigma L4263	4,2mM
Aminoácidos Essenciais	Sigma B6766	1%
Aminoácidos Não Essenciais	Gibco 11140-050	1%