

Jorge Luis Araújo Martins

**CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DA CAUDA DO EPIDIDIMO DE GATO
DOMÉSTICO (*Felis catus*) APÓS REFRIGERAÇÃO POR 24HORAS**

Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista
“Julio Mesquita Filho” Campus de Botucatu, para obtenção
do título de Mestre em Medicina Veterinária, área de
Reprodução Animal.

Orientadora: Profa. Adj. Maria Denise Lopes

Botucatu

2006

Dedico este trabalho a Mônica, Nathã e Jonas,
pelo encanto diário das suas presenças, pelo mágico
e intenso viver que eles produzem todos os dias.

A minha mãe Vânia e meu pai César, por seu amor incondicional repleto
de entusiasmo e luz, pela sua imensa força, fonte
inesgotável de inspiração e sabedoria.

AGRADECIMENTOS

A professora Maria Denise Lopes, por acreditar em mim, pela dedicação na orientação deste trabalho, por sua exigência e atenção constante. Muito obrigado a Professora e a Amiga.

Aos meus sogro e sogra, Chico e Verena, pelo acolhimento generoso, pela oportunidade única de uma convivência alegre, cheia de amizade, cultura e conhecimento.

Ao pós graduando da cirurgia e amigo, Alfredo Lima, pelo apoio cirúrgico durante a maioria das castrações realizadas. Pela amizade, interesse, dedicação e constante companheirismo.

A Fabiana Ferreira Souza e Viviane Chirinéa pela convivência diária e auxílio mútuo, pelo apoio amigo e profissional em tantos projetos.

Ao Veterinário da secretaria municipal de saúde, o amigo, Jonas Brant, pelo auxílio na obtenção de animais e por toda atenção e solidariedade.

Ao pós graduando da anestesiologia, Paulo Steagal e a Tatiana Giovanni pelas anestésias realizadas, nos procedimentos cirúrgicos do experimento, pelo bom humor e disponibilidade.

Ao professor Frederico Ozanan Papa, por tantas dúvidas tiradas, sempre com generosidade e empenho.

A pós graduanda Lílian Rigatto Martins pela realização dos procedimentos cirúrgicos nas horas de emergência, durante a execução projeto.

Ao professor César Taconelli, pela análise estatística dos resultados do experimento.

Muito obrigado a todos os professores da área de Reprodução Animal, em especial ao Prof. Sony Dimas Bicudo e Profa. Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga, que me acolheram de maneira amiga e solidária, sempre disponíveis a tirar dúvidas e auxiliar, e que direta e indiretamente contribuíram para minha formação durante o mestrado.

A equipe de residentes de 2005, principalmente a Ana Augusta Pagnano Derussi e Bruna De Vita pelo apoio cirúrgico nas horas difíceis.

Ao Walter Oswaldo Fabris, Edílson de Souza Freire, Márcio José Figueira, José Maria Pimentel e Cristina Listone Rosa, funcionários do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, pelo saudável convívio diário, por toda a atenção e bom humor.

A todos os colegas da pós-graduação que, compartilhando conquistas e dificuldades, tornaram os nossos trabalhos diários uma convivência sadia, alegre e motivadora.

"A prisão não são as grades, e a liberdade não é a rua;
existem homens presos na rua e livres na prisão.
É uma questão de consciência".

Gandhi

SUMÁRIO

Lista de Tabelas.....	10
Lista de Figuras.....	11
INTRODUÇÃO.....	13
REVISÃO DE LITERATURA.....	15
- Espermatogênese	15
- Colheita de Gametas Masculinos.....	16
- Análise Seminal.....	17
- Criopreservação de Sêmen.....	19
OBJETIVO GERAL.....	26
MATERIAL E METODOS.....	27
1. Local do Experimento.....	28
2. Animais.....	28
3. Colheita de Sêmen.....	29
4. Processamento do Sêmen.....	29
5. Análise do Sêmen.....	29
a. Motilidade e Vigor.....	30
b. Morfologia Espermática.....	30
c. Concentração Espermática.....	31

d. Integridade de Membrana.....	32
6. Meio Crioprotetor.....	34
7. Congelação.....	34
8. Descongelação.....	36
9. Análise Estatística.....	36
10. Delineamento Experimental.....	38
 RESULTADOS	39
DISCUSSÃO.....	50
CONCLUSÃO.....	57
 REFERÊNCIAS.....	59
 RESUMO.....	75
ABSTRACT.....	77

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** *Box plots* representando a variável motilidade espermática analisada nos momentos pós colheita e pós-refrigeração por 24 horas.....42
- Figura 2** *Box plots* representando a variável integridade de membrana analisada nos momentos pós-colheita e pós-refrigeração por 24 horas.....43
- Figura 3** *Box plots* representando a variável morfologia espermática analisada nos momentos pós colheita e pós-refrigeração por 24 horas.....43
- Figura 4-** *Box plots* representando a variável defeitos primários analisados nos momentos pós colheita e pós-refrigeração por 24 horas.....44
- Figura 5-** *Box plots* representando a variável defeitos secundários analisados nos momentos pós colheita e pós-refrigeração por 24 horas.44
- Figura 6-** *Box plots* representando a variável motilidade espermática analisada no momento pós-descongelação para os grupos controle e trabalho.....45
- Figura 7-** *Box plots* representando a variável integridade de membrana analisada no momento pós-descongelação para os grupos controle e trabalho.....46
- Figura 8.** *Box plots* representando a variável morfologia espermática no momento pós-descongelação para os grupos controle e trabalho.....46
- Figura 9-** *Box plots* representando a variável defeitos primários no momento pós-descongelação para os grupos controle e trabalho.....47

Figura 10- *Box plots* representando a variável defeitos secundários no momento pós-descongelação para os grupos controle e trabalho.....48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Delineamento Experimental.....	38
Tabela 2: Valores de média, mediana e desvio padrão de motilidade, vigor, integridade de membrana e morfologia espermática de sêmen obtido da cauda do epidídimo de gato doméstico, analisados nos momentos pós-colheita, pós-refrigeração e pós-descongelação os dois grupos estudados.....	40
Tabela 3: Tabela 3: Valores médios referentes às perdas de motilidade espermática e integridade de membrana entre os momentos pré-congelação e pós-descongelação, para os grupos 0 e 24 horas.....	41
Tabela 4: Resultados parciais de morfologia espermáticas pós colheita e pós refrigeração 24 horas referentes à análise de sêmen de 14 gatos, adultos. Botucatu, 2006.....	41
Tabela 5: Resultados parciais de morfologia espermáticas pós-descongelação, após a colheita (controle) e após a refrigeração por 24 horas referentes à análise de sêmen de 8 gatos, adultos,.Botucatu, 2006.....	42

INTRODUÇÃO

Todas as 36 espécies de felídeos selvagens estão incluídas nos apêndices I ou II da Convenção Internacional de Proteção a Espécies Selvagens Ameaçadas da Fauna e Flora (CITES 2005) e estão ameaçadas de extinção principalmente por perda de habitat e caça. (BALLOU; 1992, NOWELL e JACKSON, 1996 SWANSON, 2003)

Devido ao reduzido número de exemplares de cada espécie e ao isolamento geográfico causado pela fragmentação de reservas, existe atualmente uma grande ocorrência de cruzamentos entre parentes aumentando a proporção de genes homólogos e diminuindo a diversidade genética, levando a problemas como o aparecimento de doenças genéticas como, diminuição do sucesso reprodutivo e deficiências imunológicas (BALLOU, 1992; WILDT et al., 1995).

Estudos aplicando simuladores de dinâmica populacional apontam para uma grande sequência de extinções locais nos próximos anos. A perda do material genético das populações atuais representa um alto risco para no futuro, não ser possível viabilizar um manejo genético adequado (BALLOU, 1992)

O uso das técnicas de reprodução assistida, integrada a ciência da criopreservação, podem, através de um Banco de Recursos Genéticos preservar a diversidade genética existente por muitas gerações, através da inserção de genes nas populações vivas. A integração destas técnicas tem enorme potencial na colheita, movimentação e efetiva inserção de material genético em fundadores de cativeiro e em populações selvagens com problemas endogâmicos. (WILDT, SEAL e RALL, 1993; WILDT e ROTH, 1997; WILDT et al, 1995). A possibilidade de se transportar gametas refrigerados de felinos selvagens que morreram em

cativeiro, para centrais de biotecnologia, possibilitaria o aproveitamento deste material para manejo de possíveis problemas endogâmicos futuros de diferentes populações de diferentes espécies.

Além disso, o armazenamento de gametas e embriões por tempo indeterminado reduz consideravelmente o custo de manutenção das colônias em cativeiro, permitindo um redirecionamento de recursos para aspectos prioritários dos programas de conservação (SWANSON, 2003).

Como são raras as possibilidades de pesquisa usando gatos selvagens, o gato doméstico se apresenta como modelo experimental valioso servindo inclusive como receptor de embriões de pequenos felídeos (FARSTAD, 2000; GOMEZ et al , 2004).

REVISÃO DE LITERATURA

Espermatogênese

O tecido germinativo dos testículos adultos é formado por células denominadas espermatogônias, localizadas na porção basal do epitélio seminífero e sustentadas pelas células de Sertoli, que mediam sua maturação. Estas espermatogônias dividem-se várias vezes por mitose dando origem aos espermatócitos, que se dividem primeiro por meiose e em seguida por mitose, dando origem a quatro espermátides, células haplóides. Através do processo denominado espermiogênese, as espermátides se diferenciam originando os espermatozóides maduros (MANN e LUTWAK – MANN, 1981; GURAYA, 1987; BARTH e OKO, 1989).

Os espermatozóides sofrem importantes alterações morfofuncionais de maturação a medida que se deslocam da cabeça, corpo e cauda do epidídimo de modo a estabilizar seu acrossoma, peça intermediária e flagelo (GURAYA, 1987; BARTH e OKO, 1989).Dentre as principais transformações sofridas pelas células espermáticas, pode-se destacar a migração da gota citoplasmática de uma posição proximal para distal (AXNER et al, 1998), condensação da cromatina (HINGST, et al., 1995), mudança no tamanho do acrossoma (BEDFORD, 1963), início da motilidade e habilidade para reconhecer e se ligar ao ovócito (MOORE et al.,1983).

Conforme ao observado por Axner et al (1999) para a espécie *Felis catus*, a proporção de espermatozóides anormais originados no testículo decresce durante a passagem pelo epidídimo, ao passo que algumas anormalidades de cauda aumentam após a passagem pelo sistema de ductos epididimário. Neste processo

de maturação estão envolvidas diversas proteínas oriundas do fluído epididimario, que compõem juntamente com as secreções das glândulas sexuais acessórias, o plasma seminal (JOHNSTON et al., 2001).

Colheita de Gametas Masculinos

Nos machos uma atenção especial tem sido empregada na recuperação e criopreservação de sêmen obtidos por vários métodos como vagina artificial, eletroejaculação, lavagem vaginal pós-serviço e recuperação de espermatozóides a partir do epidídimo, sendo este último, aplicável a animais que passam por orquiectomia, terapia ou *post-mortem*. A sua aplicação prática, porém, requer o desenvolvimento de protocolos que sejam compatíveis com o uso a campo, sejam aplicáveis a espécies com variável qualidade de sêmen e que resultem em motilidade e função espermática aceitável após a descongelação. (SWANSON et al., 1996; JOHNSTON et al., 2001)

A colheita de sêmen após a morte do animal é importante no caso de felinos selvagens, que morrem em parques, reservas ou zoológicos, e dos quais se deseja a criopreservação do sêmen, para inseminação artificial ou estocagem por tempo indeterminado. A colheita pós-mortem de gametas é particularmente importante quando os animais representam linhagens genéticas importantes para as espécies, ou quando estas já se encontram seriamente ameaçadas. A criopreservação de sêmen, também pode ser realizada para gatos domésticos de alto valor genético ou de grande estima, que morreram abruptamente ou passaram por orquiectomia devido a alguma doença (JOHNSTON et al., 2001).

Após diversas pesquisas testando protocolos de congelação, Swanson e Wildt (1997) afirmaram ser necessários maiores estudos para refinar as técnicas

de criopreservação do sêmen de felinos e melhorar a viabilidade pós-descongelamento do gameta, pois até hoje, apenas três espécies de felinos produziram descendentes utilizando sêmen descongelado na Inseminação artificial, o Gato leopardo (*Proailurus sp*), e Jaguatirica (*Felis pardalis*), além do gato doméstico (*Felis catus*) (WILDT et al, 1992; SWANSON et al, 1996; WILDT e ROTH, 1997).

As investigações na recuperação de células espermáticas do trato reprodutivo masculino têm se dirigido para determinar as características das células espermáticas epididimárias, se estes espermatozóides são capazes de fertilizar, e se esses gametas podem interagir com o gameta feminino após A refrigeração e/ou criopreservação (GOODROWE e HAY, 1993; HAY e GOODROWE, 1993).

Análise Seminal

É comum que as taxas de volume ejaculado, concentração espermática, morfologia e motilidade variem entre os ejaculados de um mesmo gato. Ejaculados obtidos com vagina artificial, geralmente, tem volume menor (34-40 μ L) e maior concentração de espermatozóides por ejaculado (57-61 X 10⁶) que o obtido por eletroejaculação (100-223 μ L, 11-30 X 10⁶ spz/mL). A concentração de espermatozóides totais varia de 3 a 167 x 10⁶ spz/mL (SOJKA et al, 1971; PLATZ et al 1976; PLATZ e SEAGER, 1978; GOODROWE et al., 1989; HOWARD et al, 1990).

A motilidade média dos espermatozóides de gatos normospermicos esta entre 50 a 95% e o vigor entre 3 a 5. O pH caracteriza o poder tampão do ejaculado e fornece informações sobre possíveis contaminações. O pH do sêmen

do gato varia de 6,6 – 8,8 e a osmolaridade média é de 323,0 +/- 3,0 mOsmol/kg de H₂O. A fração do sêmen originada dos testículos e epidídimos é rica em fosfatase alcalina, com concentrações excedendo 160.000 UI (PLATZ et al, 1976; SEAGER e PLATZ, 1976; DOOLEY e PINEDA, 1986; JOHNSTON et al., 1988; HOWARD et al, 1993; JOHNSTON e KUZTRITZ, 2001).

Investigações científicas têm revelado que o ejaculado de diversas espécies raras e ameaçadas apresentam altas proporções de espermatozóides morfologicamente anormais.(HOWARD et al, 1993; WILDT et al, 1993a, 1995). A morfologia anormal dos espermatozóides compromete sua capacidade de migrar através do trato reprodutivo da fêmea e diminui as taxas de fertilização (MAHADEVAN et al, 1987). O gato doméstico tem servido como um valioso modelo experimental para o estudo do impacto da teratospermia sobre a função reprodutiva de felídeos selvagens (HOWARD et al, 1990).

As variáveis mais usadas para avaliar o potencial fecundante do sêmen são o número de espermatozóides normais por ejaculado e a motilidade espermática, que permitem gerar estimativas clínicas preliminares sobre a função reprodutiva dos animais (JASKO et al., 1988; ANZAR et al., 1991).

Desta maneira a avaliação da motilidade e da morfologia espermática constituem parâmetros essenciais no exame seminal e no estabelecimento de correlação entre qualidade espermática e fertilidade (VERSTEGEN et al 2002). A confiabilidade no prognóstico da capacidade funcional de um sêmen aumenta quando a avaliação da motilidade está associada à longevidade dos espermatozóides (KENNEY et al., 1971; PICKETT et al., 1988).

A subjetividade na análise visual para estimativa da motilidade espermática em microscópio de contraste de fase, produzindo variações de estimativa de motilidade de 30% a 60% num mesmo ejaculado e entre analisadores diferentes (WALKER et al, 1982; ANZAR et al 1991; JASKO et al,1992) fez surgir a necessidade de se desenvolver métodos mais objetivos de análise dos parâmetros de motilidade. Avaliações objetivas de motilidade espermática podem minimizar a grande variação individual nas estimativas desse parâmetro em amostras de um mesmo ejaculado e entre analisadores diferentes (AMANN, 1987; BURKMAN, 1984; BUDWORTH et al, 1988; AUGER e JOUANNET, 1993;).

Stachecki et al (1993) utilizaram sistemas computadorizados de análise de sêmen (CASA) para a espécie felina a partir de espermatozóides obtidos da cauda do epidídimo de gatos normospermicos e teratospermicos. Estes dados ficaram restritos aos aparelhos que tinham variáveis compatíveis com as descritas na sua publicação de 1993, quando usou o Cell Tracks System (Version 3.2, Motion Analysis Corp. Santa Rosa, Califórnia).A futura calibração de sistemas CASA Hamilton Torne IVOS para gatos domésticos, pode uniformizar os parâmetros de motilidade espermática para a espécie felina.

Criopreservação de Sêmen

A técnica de congelação constitui uma poderosa ferramenta reprodutiva, principalmente para espécies de felinos ameaçadas, e apresenta resultados satisfatórios para gatos, tanto com o sêmen ejaculado (PLATZ, et al, 1976; PLATZ e SEAGER, 1978; POPE, et al, 1991, TSUTSUI, et al, 2000; ZAMBELLI, et al, 2002; TEBET et al, 2006) quanto com sêmen proveniente do epidídimo (HAY e

GOODROWE, 1993, LENGWINAT e BLOTTNER, 1994, STACHEKI, et al, 1994; TEBET et al, 2006).

A célula espermática sofre diversas agressões durante o processo de refrigeração e congelamento, dentre os quais podemos destacar a alteração de consistência da membrana plasmática de um estado fluido para um estado de gel durante o choque frio (15°C a 5°C), a formação de cristais intracelulares, durante a congelamento, e o choque osmótico, decorrente da concentração do soluto em canais de hiperosmolaridade. A esse conjunto de alterações dá-se o nome de stress osmótico (WATSON, 2000; HOLT, 2000).

Alterações na membrana plasmática, decorrentes da exposição aos canais hiper-osmóticos ou choques de temperatura, geralmente estão associadas a desorganização dos componentes lipídicos, o que pode comprometer a permeabilidade seletiva da célula. A alteração das proteínas de membrana, que funcionam como canais iônicos, pode gerar um influxo de Ca^{++} desencadeando o processo de capacitação espermática de forma caótica e desordenada (Watson, 2000), culminando com a reação acrossômica, e inviabilizando a célula espermática para fertilização. (HOLT, 2000; MULLER, 2000).

A osmolaridade é uma das principais variáveis, para os meios de refrigeração para sêmen felino, que deve girar em torno de 290 a 320 mOsm/Kg de H_2O , faixa encontrada no próprio sêmen felino (GLOVER e WATSON, 1987; PUKAZHENTHI et al., 2001).

Glover e Watson (1987) observaram que a inclusão de diferentes monossacarídeos em diferentes meios tem pouca influência sobre a viabilidade de sêmen refrigerado de gatos domésticos.

Na refrigeração do sêmen de gato, Pukazhenth et al, (1999) constataram que taxas de refrigeração de $-0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ da temperatura ambiente para $+5^{\circ}\text{C}$ diminuem os danos estruturais na célula espermática. Já Zambelli et al. (2002), obtiveram os melhores resultados utilizando uma curva de $-0,2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 5°C .

A manutenção de amostras de sêmen a 5°C pode ser realizada por períodos de 24 horas a 5 ou 7 dias (GLOVER e WATSON, 1987; POPE, et al 1989; POPE, et al 1991; GOODROWE e HAY 1993;). Harris et al., (2002) demonstraram o desenvolvimento de blastocistos após fertilização *in vitro* de ovócitos de gato com espermatozoides estocados a 4°C por 14 dias.

Villaverde et al, (2004), em estudo avaliando a resistência de sêmen de gato a diferentes períodos de refrigeração, observaram a manutenção da motilidade espermática média em $60,3 \pm 14,9$ e vigor $3,1 \pm 0,7$ após 72 horas de refrigeração a 5°C em meio TRIS/Equex/Gema de ovo, embora também tenham observado uma queda significativa em relação ao momento pós colheita.

A estocagem de sêmen esta sujeita ao acúmulo de substâncias oxigênio reativas. Estudos utilizando taurina a 25mM e 50mM demonstraram uma melhor preservação da motilidade pós-descongelação de sêmen proveniente do epidídimo, embora também tenha sido observado que a taurina induz a capacitação espermática (LUVONI et al, 2002).

O sucesso da criopreservação de sêmen de gato doméstico depende de fatores inerentes ao sêmen e ao animal e outros relacionados a sua manipulação laboratorial. Diversos trabalhos tem pesquisado diferentes meios, diferentes protocolos de refrigeração e congelação e diferentes concentrações de crioprotetor. Resultados têm demonstram uma perda média pós-descongelação de

20 a 50% na motilidade e de 15 a 30% de aumento nas anormalidades acrossomais (ZAMBELLI et al, 2002; BARAN et al, 2004, TEBET et al, 2006).

A congelação lenta da célula espermática resulta em exposição dos espermatozóides aos canais hiper-osmóticos de água não congelada que se formam pela congelação parcial da água extracelular na faixa de 0° a -50° C. Este efeito causa a desidratação celular e efluxo de íons (MAZUR, 1984). A exposição prolongada a um meio hipertônico pode resultar em lesões a membrana plasmática dos espermatozóides por remoção de proteínas estruturais (HOLT, 2000). Pukazhenthil et al, 2001 constataram que o “stress” hipertônico afeta mais a motilidade do que a membrana citoplasmática da célula espermática de felinos.

Os crioprotetores intracelulares são caracterizados pelo baixo peso molecular e por sua propriedade coligativa que reduz a formação de cristais de gelo durante a congelação, com isso reduz a concentração de eletrólitos na fração não congelada, e desta maneira diminui os efeitos deletérios da hiperosmolaridade durante a congelação. O crioprotetor de eleição para espermatozóides de felinos é o glicerol (PLATZ et al, 1976; WATSON, 1990).

Moiles et al, (1997) acreditam que o glicerol altere a interação entre as proteínas de membrana e o citoesqueleto, tornando a célula espermática mais tolerante ao estresse osmótico e o conseqüente fluxo de água pela membrana.

Pope et al, (1991) propuseram um protocolo de criopreservação de sêmen para gatos domésticos, que tem sido utilizado de maneira padrão em experimentos com bons resultados: após estabilização a 5° C, as palhetas com o sêmen são transferidas para uma tela a 6 cm de altura do nível da coluna líquida

de N₂ por 20 minutos, realizando uma curva de congelação de -10^o C/minutos, de 5^o C a -80^o C, e posterior imersão no nitrogênio líquido.

Zambelli et al. (2002) constataram que a velocidade de congelação de -3,85^o C/ min até a temperatura de -40^o C, e posterior imersão no nitrogênio líquido, produz resultados de perda de motilidade e danos acrossomais pós-descongelação bem inferiores as velocidades de -9^o C , -22,8^o C , -36^o C e -43^o C por minuto.

Os efeitos adversos da adição do glicerol podem ser minimizados em temperaturas mais baixas (WATSON, 1990). Por esta razão alguns autores defendem que o glicerol seja acrescentado numa segunda diluição após a refrigeração a 5^o C (AXNER e LINDE FOSBERG, 2002; GIL et al, 2003).

O uso de Equex em meios para congelação mostrou uma clara proteção a integridade acrossomal de espermatozóides de felinos provenientes do epidídimo durante os processos de congelação e descongelação (AXNER et al, 2003).

Em estudo conduzido por Medrano et al em 2002 utilizando criomicroscópio observou-se que as membranas plasmáticas dos espermatozóides permaneceram intactas durante a congelação até -50^o C, embora o sêmen quando reaquecido apresentasse alto índice de células com membranas lesadas. Esta observação sugeriu que a descongelação de amostras criopreservadas seja um dos momentos críticos do processo de conservação de gametas masculinos.

A descongelação deve ser realizada de forma coerente com a velocidade de congelação utilizada, ou seja, se uma amostra for congelada de maneira rápida, não haverá tempo suficiente para que haja o efluxo de água, e haverá formação de cristais de gelo intracelulares, desta maneira, a descongelação

deverá ser realizada de maneira também rápida para se evitar a recristalização da água intracelular e conseqüente rupturas de membrana. Se a amostra for congelada de maneira lenta a descongelação deverá também ser realizada de maneira lenta a fim de evitar a ruptura celular por influxo rápido de água na célula espermática (HOLT, 2000; MAZUR E KOSHIMOTO, 2002).

O uso de estimulantes como a cafeína, pentoxifylina e 2-deoxiadenosina tem efeito dose dependente sobre o aumento de motilidade do espermatozóide descongelado do epidídimo de gatos domésticos, reduzindo a perda da motilidade pós-descongelação em cerca de 10% (STACHECKI et al, 1994).

O método de colheita do sêmen demonstrou não interferir na congelabilidade do sêmen de gato doméstico. Tebet et al (2006), não observaram diferenças significativas pós-descongelação entre o sêmen obtido da cauda do epidídimo e o colhido por eletroejaculação, para as variáveis de motilidade espermática, vigor e integridade de membrana.

Estudos conduzidos por Kashiwasaki et al, (2005) observaram uma motilidade média de 31,8% e de 32,2 % de membrana íntegra, para sêmen descongelado do epidídimo de gato doméstico, utilizando meio com 3% de glicerol. A refrigeração foi realizada a +5^o C por 180 minutos.

A capacidade de fertilização de espermatozóides descongelados de gatos foi demonstrada inicialmente por Platz et al em 1976, quando seu estudo reportou uma taxa de 10% de concepção após inseminação artificial intravaginal com sêmen descongelado de gato doméstico.

Em 2000, Tsutsui et al conseguiram taxas de concepção de 57% realizando IA Intrauterina, com sêmen epididimário refrigerado. Foi também Tsutsui et al

(2003), que obtiveram os primeiros filhotes de gatos domésticos obtidos por IA a partir de sêmen epididimário descongelado, com taxas de concepção de 27,3%.

O uso de sêmen descongelado tanto do ejaculado quanto o colhido da cauda do epidídimo tem conquistado resultados promissores após uso em a Fertilização In –Vitro (FIV) obtendo taxas de clivagem acima de 72% e frequência de mais de 32% de blastocisto. (LENGWINAT E BLOTTNER, 1994; KARJA et al, 2002a; KARJA et al, 2002b).

Pesquisas utilizando Injeção Espermática Intracitoplasmática (ICSI) com sêmen descongelado proveniente do epidídimo de gatos domésticos, tem alcançado a frequência de 82% de taxa de clivagem e 7% de incidência de blastocisto(BOGLIOLO et al, 2001).

Objetivo do Experimento

- Avaliar o efeito da refrigeração prolongada sobre a congelabilidade do sêmen obtido da cauda do epidídimo de gato doméstico.

A fim de atingir este objetivo comparamos a congelabilidade de sêmen após a refrigeração a 5°C por 24 horas, com a congelação imediata pós-colheita.

MATERIAL E MÉTODOS

Localização do Experimento:

Este trabalho foi desenvolvido no Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Campus de Botucatu.

Animais:

Foram utilizados quinze (15) gatos adultos, sem interesse racial, em bom estado nutricional, com histórico reprodutivo recente de cobertura, selecionados para a realização de orquiectomia de conveniência. Os animais foram mantidos isolados por dois dias, no Gatil do Hospital Veterinário, para avaliação clínica, comportamental e repouso sexual.

Contenção Química:

Após jejum prévio de 08 horas, os animais foram submetidos à contenção química utilizando:

1. Cloridrato de ketamina: 15 mg/Kg
2. Xilasina: 1mg/kg

Avaliação da genitália externa:

Os testículos foram avaliados com relação a sua consistência. Também foram avaliadas a presença de secreções no prepúcio e glândula e a presença de espículas penianas.

Orquiectomia:

A cirurgia foi realizada conforme técnica convencional. Os testículos e epidídimos foram transportados em solução salina a 37° C até o laboratório onde foram processados.

Colheita do Sêmen:

Após o isolamento dos epidídimos (cauda) e parte dos ductos deferentes, essas estruturas foram comprimidas com auxílio de uma pinça para a retirada da secreção epididimária, em placa de Pétri, contendo 350 µl de meio TRIS / Equex / Gema de ovo (quadro 2, pg.34) para cada epidídimo, totalizando um volume de 700µl

Processamento do Sêmen:

De um volume total de 700 µl procedeu-se as seguintes divisões:

➤ Duas alíquotas de 350 µl cada:

- 1) análise do sêmen e congelação imediata – grupo controle
- 2) refrigeração por 24 horas a 5°C, posterior análise e congelação – grupo trabalho

Avaliação do sêmen:

As células espermáticas foram avaliadas sob os aspectos morfofuncionais em 4 momentos:

M1 – Após a colheita;

M2 – Após a refrigeração a 5°C por 24 horas;

M3 - Após a descongelação das amostras do grupo controle;

M4 - Após a descongelação das amostras do grupo trabalho.

As técnicas de avaliação utilizadas neste experimento estão detalhadas a seguir:

Motilidade e vigor:

Uma alíquota de sêmen de 2 µl foi depositada diretamente sobre uma lâmina de vidro pré-aquecida a 37^o C, coberta por uma lamínula e observada em microscópio de contraste de fase (Carl Zeiss, Alemanha) nos aumentos de 100 x e 200 x.

A avaliação foi baseada na técnica descrita por Krause (1966) onde a motilidade é expressa em porcentagem de movimento progressivo numa escala de 0 a 100% sendo 0 para todos os espermatozóides imóveis e 100% para performance máxima com movimento progressivo.

A qualidade do movimento executado pelos espermatozóides foi avaliado pelo vigor dentro de uma escala de 0 a 5 , sendo:

- 0 – Sem movimento;
- 1 – Fraco movimento lateral com alguma progressão;
- 2 – Moderado movimento lateral com ocasional progressão;
- 3 – Progressão lenta;
- 4 – Progressão regular;
- 5 – Progressão rápida

Morfologia Espermática:

Foi utilizada a técnica descrita por Pope et al. (1991) para coloração de espermatozóides.

A técnica consiste na diluição do sêmen em citrato de sódio 2,9% na proporção 9:1 seguida da adição do corante de “Pope” (1% *rosa bengala*, 1% *fast green FCF* e 40 % *etanol* em uma solução tampão de *fosfato dissódico 0,2 M + ácido cítrico 0,1M*) na proporção 1:1.

Essa amostra foi mantida em temperatura ambiente por 70 segundos e em seguida realizou-se um esfregaço em lâmina de vidro.

As lâminas foram avaliadas em um microscópio óptico de contraste de fase, nos aumentos (400X e 1000X) quanto à ocorrência de espermatozóides normais e anormais na contagem total de 100 células. Os espermatozóides anormais foram classificados em defeitos maiores e menores de acordo com sua influência na fertilidade (BARTH e OKO, 1989) e os resultados foram expressos em porcentagem.

Concentração Espermática:

Utilizou-se a diluição de 1:10 de sêmen em água destilada. Uma alíquota dessa diluição (20µL) foi depositada em ambos os lados da câmara de Neubauer e foram contados os espermatozóides presentes em cinco quadrantes dos dois lados da câmara, a partir da observação em microscópio óptico de contraste de fase no aumento de 200 X.

A concentração por mL foi determinada pela aplicação da fórmula:

$$C = \{ (5 \times 10 \times N \times D \times 10^3 \text{ sptz/mL}) \times 0,7 \} \text{ sptz totais}$$

Onde:

- **C** é a concentração.
- **5** é o número de quadrantes contados em cada lado da câmara.
- **10** é a altura entre a câmara e a lamínula.
- **N** é a média do número de espermatozóides contados em cada lado da câmara.
- **D** é o fator de diluição (10).
- **10^3** correspondente a transformação do valor de mm^3 para mL.
- **0,7 mL** o volume de diluente usado para obter o número de sptz totais.

Integridade de Membrana:

A integridade da membrana foi avaliada pela técnica de coloração fluorescente, descrita por Harrison & Vickers (1990). Uma alíquota de 5 μL do sêmen foi diluída em 20 μL da solução de trabalho (quadro1), contendo iodeto de propídio e carboxifluoresceína. A partir das soluções de estoque de fluoresceína, iodeto de propídeo e de formaldeído foi elaborada a solução trabalho. Foram contadas 100 células classificadas como integras ou lesadas.

As soluções utilizadas foram:

Quadro1: Composição das soluções estoque e trabalho utilizado para o teste de integridade de membrana. Botucatu, 2006.

SOLUÇÃO ESTOQUE			SOLUÇÃO TRABALHO
DESCRIÇÃO		COMPOSIÇÃO QUANTIDADE	20
1.Solução estoque de Fluoresceína	Diacetato de Carboxifluoresceína	9,2 mg	
	DMSO	20 mL	
2. Solução estoque de iodeto de propídeo	Iodeto de Propídeo	10 mg	10
	Solução Fisiológica	20 mL	
3. Solução de formaldeído	Formalina a 40%	1%	10
	Solução Fisiológica	80%	
4. Citrato de Sódio 3%			0,96 mL

A leitura foi realizada em microscópio de epifluorescência (400X) (Nikon, Japão) e a interpretação foi realizada pela contagem de células coradas em verde, ou seja, células com membrana plasmática íntegra. A coloração vermelha indica a entrada do iodeto de propídeo no interior da célula, o que é indicativo de lesão de membrana.

Meio Crioprotetor

O meio utilizado para refrigeração e congelação foi o TRIS, Equex, Gema de Ovo (TE) e com Glicerol (TEG):

Quadro 2: Composição do meio TRIS/ Equex/gema de ovo com e sem glicerol. Botucatu, 2006.

	TE	TEG
Componentes	Quantidades	
TRIS	2.4g	2.4g
Ácido Cítrico	1.4g	1.4g
Glicose	0,8g	0,8g
Sulfato de Amicacina	0,2g	0,2g
Gema de Ovo	20 mL	20 mL (20%)
Equex	1 mL	1 mL
Água destilada e deionizada	Completa para 100 mL	Completa para 100 mL
Glicerol	-	8 mL (8%)

Os meios foram aliquotados em “ependorfes” de 1,5 mL e armazenados em freezer a -10° C. Todas as amostras foram diluídas, refrigeradas e congeladas utilizando a mesma partida de meio.

Congelação:

Uma alíquota do grupo controle (100µl) foi analisada imediatamente após a coleta para as características morfofuncionais, já descritas anteriormente. O restante 250µl foi submetido ao processo de congelação.

Congelação do grupo controle:

Os 250µl restantes foram acondicionados em “ependorfes” e refrigerados conforme descrição abaixo:

Para obtenção da curva de refrigeração utilizada (-0,5° C/minuto.) as amostras alicotadas foram transferidas para um recipiente de alumínio contendo 600 mL de água em temperatura ambiente, permitindo total imersão do sêmen. O recipiente de alumínio foi introduzido em um refrigerador programado para uma temperatura de 5°C, originando dessa forma uma curva de refrigeração de -0,5° C/minuto (BICUDO et al, 1991). A amostra permaneceu em refrigeração pelo período de uma hora.

Em seguida procedeu-se a glicerolização, com a adição de 250µl de TEG (Tris/ Equex/ glicerol 8%) na proporção de 1:1. A amostra permaneceu na temperatura de refrigeração por mais 10 minutos para estabilização, após o que foi envasada em palhetas francesas de 0,25mL.

As palhetas foram transferidas para uma tela a 06 cm de altura da coluna líquida de N₂, perfazendo uma curva de -10° C /minuto até uma temperatura final de -80° C (POPE et al, 1999), dentro de uma caixa de isopor, e mantidas assim por 20 minutos. Em seguida as amostras foram imersas em N₂ e transferidas e

armazenadas em botijão criogênico a -196°C para posterior descongelação e análise.

Congelação do grupo trabalho:

A amostra do grupo trabalho foi refrigerada de forma idêntica à descrita para o grupo controle e mantida a temperatura de 5°C por um período de 24 horas. Após este período uma alíquota de análise (100 μl) foi retirada para avaliação morfofuncional e ao restante (250 μl) foi glicerolizada, envasada, estabilizada e congelada executando a mesma metodologia descrita para o grupo controle.

Todo o material usado na glicerolização e envase das amostras foi mantido a temperatura de 5°C em todos os procedimentos.

Descongelação:

A descongelação das amostras foi realizada por imersão em Banho Maria a 37°C por 30 segundos e posterior análise morfofuncional.

Análise Estatística:

Realizou-se inicialmente uma análise de estatística descritiva (média, mediana e desvio padrão) para todas as variáveis e tempos analisados. A diferença obtida entre os resultados dos grupos controle e trabalho, foi testada utilizando o teste t para amostras dependentes (VIEIRA, 1980), quando a distribuição normal foi observada (o que ocorreu apenas para a integridade de

membrana). Caso contrário, utilizou-se o teste de postos assinalados de Wilcoxon (VIEIRA, 2003), que serve para avaliar a hipótese nula de que na população original de diferença entre os pares, a diferença mediana é igual a zero. Todas as análises utilizaram um nível de significância de 5%, (ou seja, $p < 0,05$) para diferenças significativas das variáveis analisadas entre os diferentes períodos.

Tabela 1. Delineamento Experimental.

Grupo	Controle (0h)		Trabalho (24h)	
Alíquota	Análise	Congelação	Análise	Congelação
Volume	100 µL	250 µL	100 µL	250 µL
Refrigeração a +5° C (-0,5° C por min.)	-	Por 1 hora Pós-extração	24 horas pós-extração	Por 24 horas pós-extração
Análise	Pós-extração	Pós-descongelação	Pós 24 horas	Pós-descongelação
Glicerolização (1:1 8% de glicerol)	-	Após 1h a +5° C	-	Após 24 h a +5° C.
Estabilização	-	10 min.	-	10 min.
Envase a +5° C	-	palhetas 0,25 mL	-	palhetas 0,25 mL
Congelação em N2 (-10° C por min.)	-	20' e imersão em N2	-	20' e imersão em N2

RESULTADOS

Os valores médios, de mediana e desvio padrão dos resultados referentes às análises seminais pós-coleta, pós-refrigeração e pós-descongelamento dos grupos controle e trabalho, encontram-se na tabela 2.

Tabela 2: Valores médios, mediana e desvio padrão de motilidade, vigor, integridade de membrana e morfologia espermática de sêmen obtido da cauda do epidídimo de gato doméstico, analisados nos momentos pós-colheita, pós-refrigeração e pós-descongelamento dos dois grupos estudados. Botucatu, 2006.

	Mot (%)		Vigor (0 a 5)		Íntegros (%)		Normais	
	0h	24h	0h	24h	0h	24h	0h	24h
Pós-refrigeração								
Média	87,33	77,67	4,60	4,07	81,07	74,73	73,33	68,60
Mediana	90	80	5	4	82	74	75	70
Desvio Padrão	5,63	15,68	0,51	0,80	7,15	8,84	6,99	10,08
Pós-descongelamento								
Média	42	40	2,90	2,77	42,13	49,40	66,2	61,8
Mediana	40	35	3	3	43	55	68	62
Desvio Padrão	24,55	21,13	0,76	0,73	14,44	16,07	8,74	8,82

Os resultados relativos a análise comparativa entre os períodos pós-colheita e pós-refrigeração por 24 horas e entre os grupos controle e trabalho após a descongelamento das amostras encontram-se detalhados nas figuras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10.

Tabela 3: Valores médios referentes às perdas de motilidade espermática e integridade de membrana entre os momentos pré-congelação e pós-descongelação, para os grupos 0 e 24 horas. **Botucatu, 2006.**

	Perda de Motilidade		Perda de Íntegridade de Membrana	
	0 h.	24 h.	0 h.	24 h.
Médias	45,33	47,33	38,93	31,00
Desvio Padrão	22,64	20,34	12,10	15,71

TABELA 4: Resultados parciais de morfologia espermáticas pós colheita e pós refrigeração 24 horas referentes à análise de sêmen de 14 gatos, adultos. Botucatu, 2006.

Animal	Normais(%)		Patologia Prim(%)		Patologia Séc. (%)	
	0h	24h	0h	24h	0h	24h
1	64	67	02	14	34	19
2	76	65	10	20	14	15
3	59	74	36	24	11	02
4	74	62	15	20	11	18
5	82	71	09	17	09	12
6	79	72	13	17	08	11
7	81	69	15	17	04	14
8	72	85	12	04	16	11
9	76	81	14	13	10	06
10	75	63	19	19	06	16
11	74	41	09	38	17	21
12	75	74	09	13	16	13
13	60	72	08	15	32	13
14	75	70	17	22	08	08
15	78	61	12	32	10	07

TABELA 5: Resultados parciais de morfologia espermáticas pós descongelação, após a colheita (controle) e após a refrigeração por 24 horas referentes à análise de sêmen de 8 gatos, adultos,.Botucatu, 2006.

Animal	Normais (%)		Patologia Prim (%)		Patologia Séc. (%)	
	0h	24h	0h	24h	0h	24h
1	56	65	24	09	20	26
2	64	59	15	23	21	18
3	74	50	11	18	15	32
4	78	70	15	20	07	10
5	74	62	15	20	11	18
6	59	57	30	26	11	17
7	74	63	20	24	06	13
8	72	80	12	10	16	10
9	77	74	13	11	10	15
10	55	60	19	19	26	11
11	55	51	19	31	26	18
12	65	51	17	24	18	25
13	53	51	18	21	29	27
14	68	62	13	25	19	13
15	69	65	15	23	16	12

1-MOMENTO PÓS-COLHEITA X PÓS-REFRIGERAÇÃO POR 24 HORAS

1.1-Motilidade Espermática

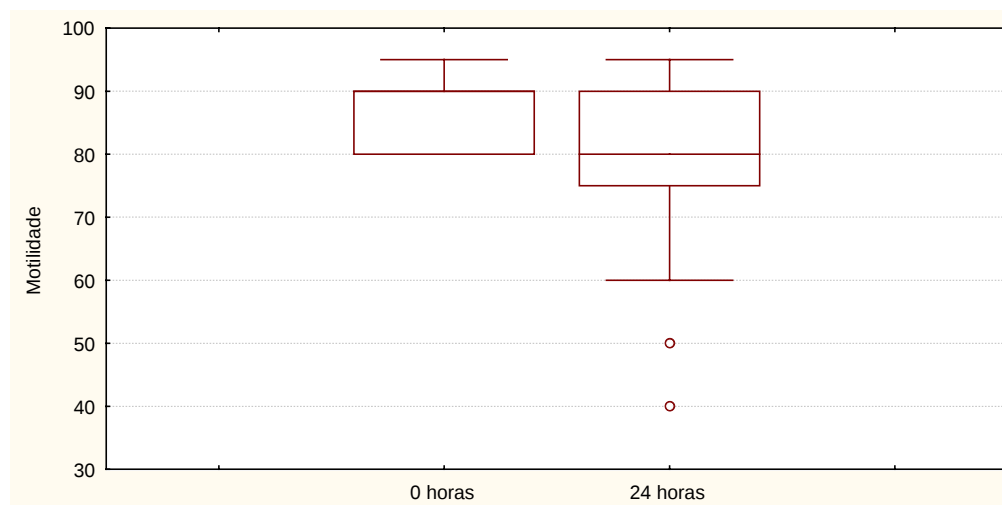


Figura 1- *Box plots* representando a variável motilidade espermática analisada nos momentos pós colheita e pós-refrigeração por 24 horas. Botucatu, 2006.

Valores de motilidade espermática foi observado uma diferença significativa, entre os momentos pós-colheita e pos-refrigeração por 24 horas ($p=0,01$).

1.2-Vigor Espermático

Foi verificado uma diferença significativa de vigor espermático entre os dois grupos – pós-colheita e pós-refrigeração por 24 horas. Neste caso observou-se maior vigor para o grupo pós-coleta (0hs) ($p = 0,04$).

1.3- Integridade de Membrana -Espermatozóides Íntegros

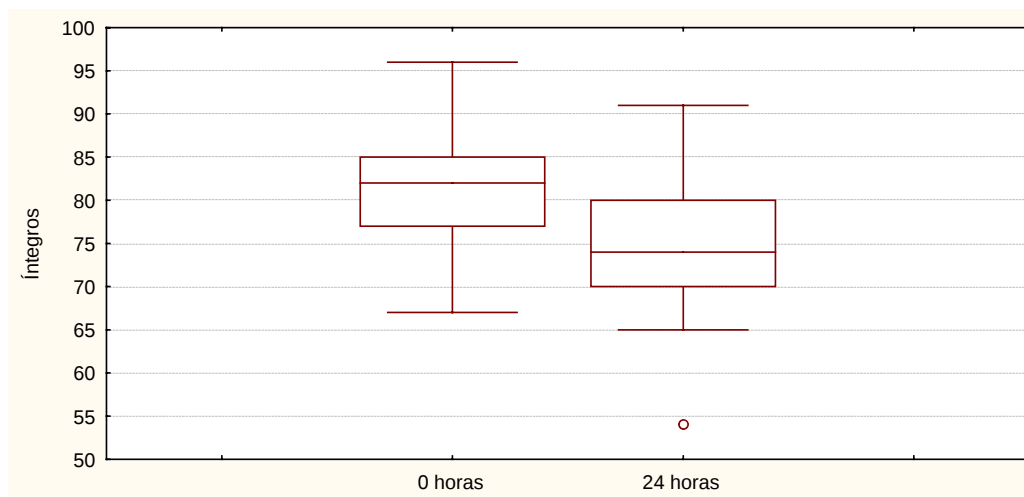


Figura 2 *Box plots* representando a variável integridade de membrana analisada nos momentos pós-colheita e pós-refrigeração por 24 horas. **Botucatu, 2006.**

Foi observada uma diferença significativa entre os momentos pós-colheita e pós-refrigeração para a variável integridade de membrana ($p = 0.003$).

1.4-Morfologia Espermática



Figura 3 *Box plots* representando a variável morfologia espermática analisada nos momentos pós colheita e pós-refrigeração por 24 horas. **Botucatu, 2006.**

Não foi observada diferença significativa entre os momentos pós-colheita e pós-refrigeração para a variável morfologia espermática ($p= 0.27$)

1.5-Defeitos Maiores

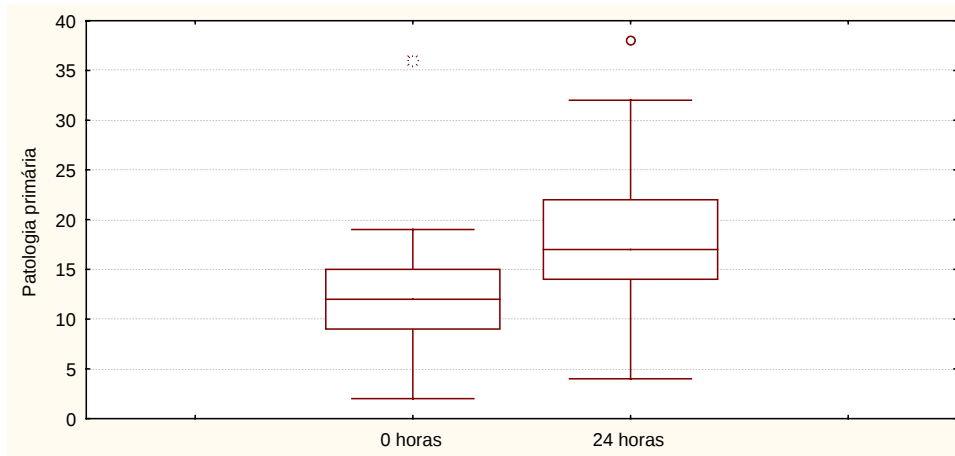


Figura 4- *Box plots* representando a variável defeitos primários analisados nos momentos pós colheita e pós-refrigeração por 24 horas. **Botucatu, 2006.**

Foi observada uma diferença significativa entre os momentos estudados para a variável patologia primária ($p =0,04$).

1.6-Defeitos Menores

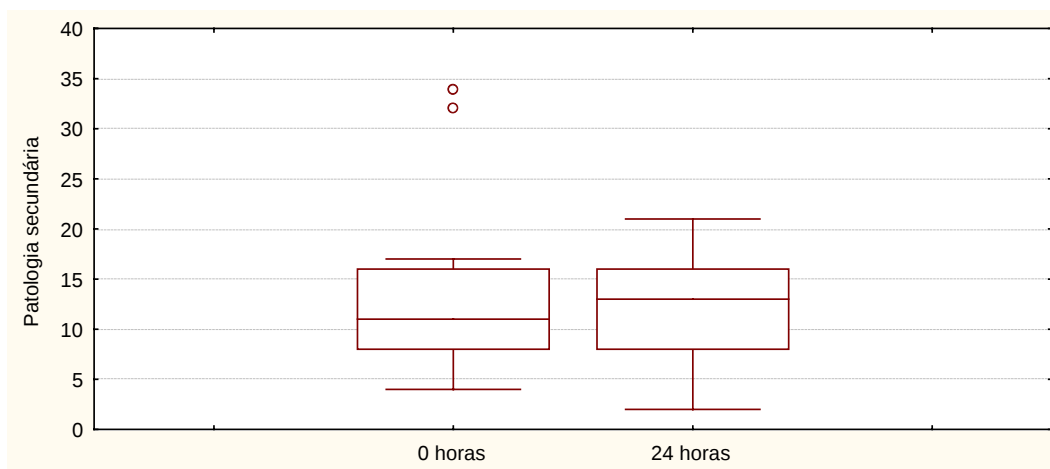


Figura 5- *Box plots* representando a variável defeitos secundários analisados nos momentos pós colheita e pós-refrigeração por 24 horas. **Botucatu, 2006.**

Não houve diferença significativa para defeitos secundários nos dois grupos avaliados ($p = 0,71$).

2-MOMENTO PÓS-DESCONGELAÇÃO – GRUPO CONTROLE X GRUPO TRABALHO.

2.1-Motilidade Espermática

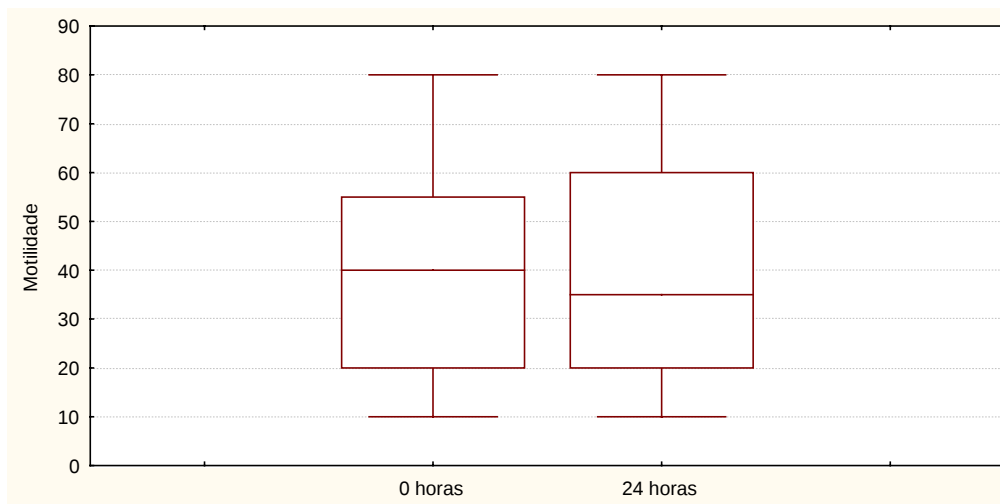


Figura 6- *Box plots* representando a variável motilidade espermática analisada no momento pós-descongelamento para os grupos controle e trabalho. **Botucatu, 2006.**

Não foi observada diferença significativa para a variável motilidade espermática entre os dois grupos estudados ($p=0,43$).

2.2-Vigor Espermático

Não houve diferença significativa para o vigor espermático entre os dois grupos avaliados para ($p=0,55$).

2.3-Integridade de Membrana - Espermatozóides Íntegros

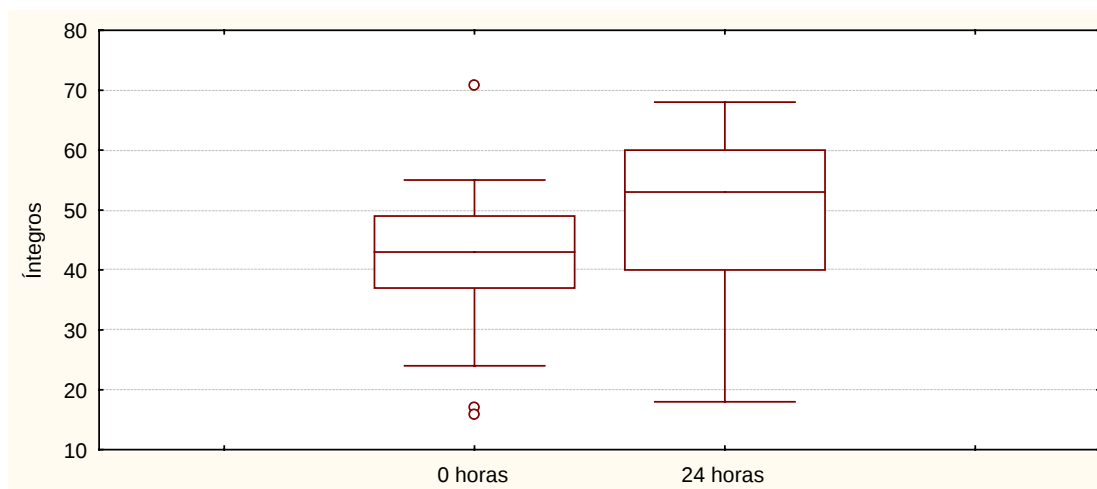


Figura 7- *Box plots* representando a variável integridade de membrana analisada no momento pós-descongelação para os grupos controle e trabalho. **Botucatu, 2006.**

Não houve diferença significativa para a porcentagem de espermatozóides íntegros entre os dois grupos ($p = 0.24$).

2.4-Morfologia Espermática

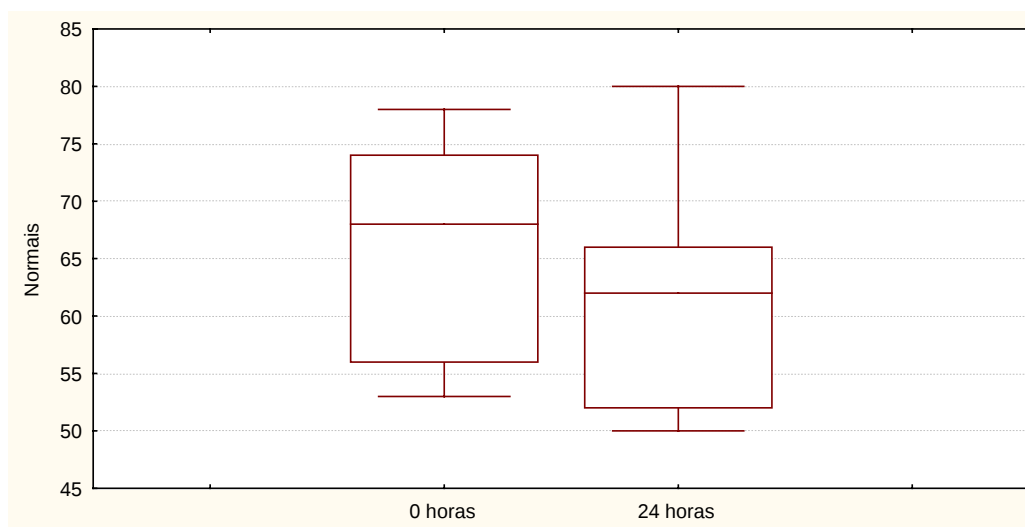


Figura 8. *Box plots* representando a variável morfologia espermática no momento pós-descongelação para os grupos controle e trabalho. **Botucatu, 2006.**

Não foi observada diferença significativa para a variável morfologia espermática entre os diferentes grupos analisados($p = 0.09$).

2.5-Defeitos Maiores

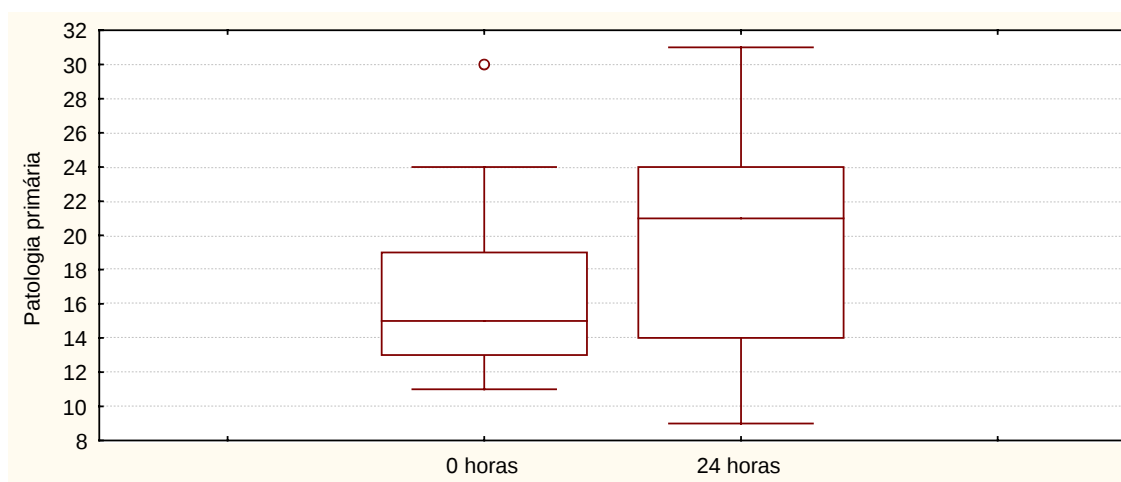


Figura 9- *Box plots* representando a variável defeitos primários no momento pós-descongelção para os grupos controle e trabalho. **Botucatu, 2006.**

Nenhuma diferença significativa foi observada para a variável defeitos primários entre os diferentes grupos avaliados para $p = 0.08$.

2.6-Defeitos Menores

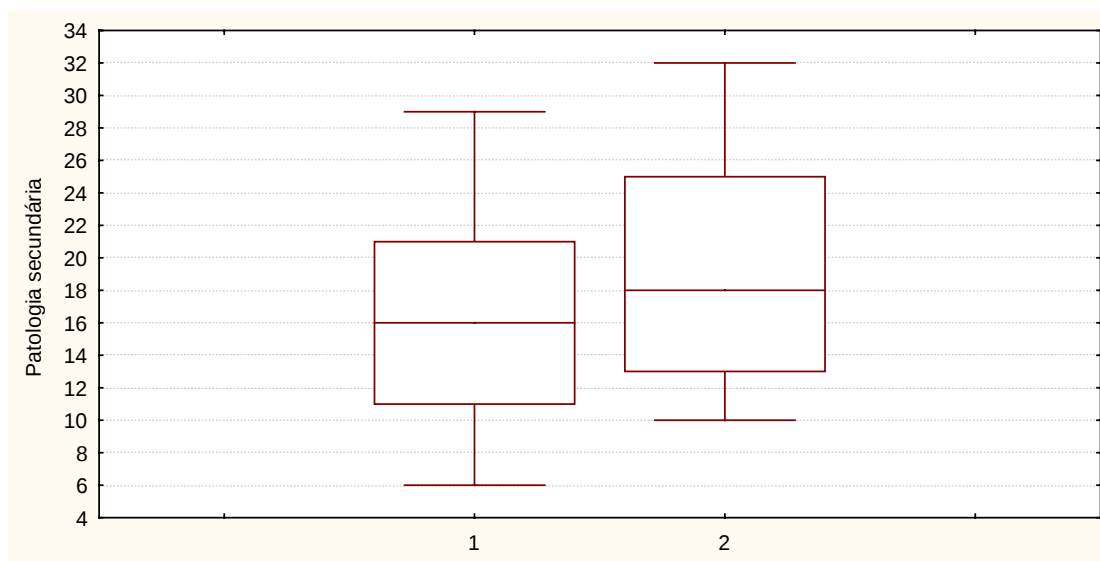


Figura 10- *Box plots* representando a variável defeitos secundários no momento pós-descongelamento para os grupos controle e trabalho. **Botucatu, 2006.**

Nenhuma diferença estatísticas entre os grupos analisados foi observada para a variável defeitos secundários($p=0,41$).

DISCUSSÃO

A possibilidade de se realizar o transporte refrigerado de gametas de animais selvagens para centrais de criopreservação, sem comprometer sua viabilidade pós-descongelação, abre espaço para estratégias muito mais eficientes de conservação do material genético de felinos ameaçados de extinção. A colheita de sêmen da cauda do epidídimo de animais mortos é o último recurso para se garantir o uso futuro destes gametas num programa de proteção das espécies. O sucesso do transporte deste tipo de material é crucial para se viabilizar a criação de um banco genético para felinos selvagens, aproveitando os gametas dos animais que morrem em cativeiro ou em vida livre, possibilitando sua utilização posterior, integrada a outras biotecnologias, num plano de manejo populacional.

A proximidade filogenética do gato doméstico com os felídeos de uma maneira geral, permite que esses animais sejam usados como modelo experimental, aperfeiçoando diversas técnicas de reprodução assistida, possibilitando grandes avanços científicos e a transferência dessas experiências para o entendimento da fisiologia reprodutiva de espécies selvagens ameaçadas de extinção.

De acordo com as observações realizadas durante esse trabalho de pesquisa pode-se verificar que a recuperação de sêmen da cauda do epidídimo é uma metodologia viável, prática e factível para a conservação de espermatozóides de gato domésticos, com o objetivo de criopreservação para utilização futura (WILDT et al, 1992; GOODROWE e HAY, 1993; HAY e GOODROWE, 1993; SWANSON et al., 1996; WILDT e ROTH, 1997; JOHNSTON et al., 2001.)

Os valores médios obtidos para a motilidade e vigor espermáticos pós-colheita do sêmen em meio TE, foram de 87,33% e 4,6% respectivamente. Os valores médios de motilidade encontrados na literatura para sêmen felino proveniente do epidídimo foram de 60 % (AXNER et al, 1999) diluídos em solução fisiológica e 65% para os extraídos em meio PBS (SCHAFER e HOLZMANN, 2000) e entre 71 e 79% nos estudos conduzidos por Goodrowe e Hay, 1993 e por Hay e Goodrowe, 1993 respectivamente.

O valor médio obtido de integridade de membrana no sêmen pós-extração foi de 81% +/- 7,6. Este valor foi superior ao descrito por Tebet, et al, 2006, cujo resultado foi de 71,7 +/- 18,8 em sêmen da cauda do epidídimo, e 72,8 +/- 9,7 para sêmen obtido por eletroejaculação. Provavelmente a diluição prévia do sêmen em um meio a base de TRIS/Gema de ovo/glicose/equex/amicacina/acido cítrico e a supressão do procedimento de centrifugação seja responsável pela superioridade dos valores de integridade de membrana em nosso trabalho.

Todas as amostras de sêmen analisadas após a colheita apresentaram porcentagem de espermatozóides normais superior a 60% (73,3 +/- 6,9) que classificam os animais utilizados como normospermicos segundo Pukazhenth et al (2001, 2006). Valores equivalentes foram descritos por Goodrowe e Hay, 1993; Hay e Goodrowe, 1993; onde o total de formas anormais de espermatozóides epididimários oscilou entre 36 a 54%. Swanson et al (2003) observou que 28 das 37 espécies de felinos podem ser classificadas como teratospérmica por apresentarem mais de 60% de formas anormais nos seus ejaculados.

O abaixamento de temperatura a 5°C possibilita uma redução no metabolismo celular importante para a manutenção da viabilidade dos

espermatozóides. No processo de refrigeração é importante se considerar o meio extensor utilizado e a curva de refrigeração; nesse sentido utilizamos um meio diluidor que inclui a gema do ovo, que possui na sua constituição lipoproteínas de baixa densidade que protegem a membrana plasmática do choque térmico, e uma curva de refrigeração ($-0,5^{\circ}\text{C}/\text{min.}$) considerada intermediária (BICUDO et al, 1991).

Foi observada uma queda significativa da motilidade, do vigor, do percentual de células integras e defeitos primários após a refrigeração por 24 horas, demonstrando que mesmo em condições consideradas adequadas de meio diluidor e curva de refrigeração houve um efeito negativo conseqüente do choque frio. Tais observações já haviam sido observada em experimento conduzido por Villaverde et al (2004) onde foi verificada uma queda significativa nos parâmetros de motilidade e vigor espermático após refrigeração prolongada por período de 24, 48 e 72 horas, utilizando sêmen da cauda do epidídimo de gatos domésticos. Zambelli et al, (2002), não observaram queda significativa da motilidade pos-refrigeração, utilizando uma curva de refrigeração de $-0,2^{\circ}\text{C} / \text{minuto}$ e estabilizando a amostra a $+5^{\circ}\text{C}$ por 25 minutos.

Mesmo com uma queda significativa de algumas variáveis a qualidade espermática não foi comprometida a ponto de inviabilizar o processo de congelação (Tab. 2).

Em relação aos resultados obtidos após a descongelação entre os grupos controle e trabalho não se observou diferença significativa para nenhuma das variáveis analisadas, independente dos resultados obtidos após a refrigeração.

A análise dos resultados nos permite inferir que as perdas de motilidade e integridade de membrana foram menores no grupo trabalho (tab.2) quando comparado ao grupo controle. Estes resultados provavelmente se devem a um período de estabilização maior associado a um meio capaz de conferir maior proteção à célula espermática e conseqüentemente uma maior resistência celular a crioinjúria.

As médias de motilidade e vigor pós-descongelação foram de $40\% \pm 21$ e $2.7 \pm 0,73$, respectivamente, inferior as obtidas por Tebet et al, 2006 ($59 \pm 19,1\%$ e $3.4 \pm 0,7$) e Zambelli et al, 2002 ($49,66 \pm 8,7\%$), e superiores as obtidas por Kawazaki et al, 2005 ($31,8 \pm 2,4\%$) e Tsuitsui et al, 2002 ($24,0 \pm 4,4\%$). Os protocolos de congelação e as concentrações de crioprotetores foram diferentes entre os autores discutidos.

Tebet et al (2006) utilizou um meio diluidor com 7% de glicerol, glicerolização da amostra em temperatura ambiente e uma curva de refrigeração de $0,3^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$. Todas estas modificações podem ser responsáveis e ter contribuído para obtenção de valores superiores de motilidade e vigor pós-descongelação.

Os valores médios de integridade de membrana pós-descongelação para o grupo trabalho foi de 49%, superior a descrita por Kashiwasaki, 2005, que obteve valores de $32,2\% \pm 4,2$, com um meio diluente contendo 3% de glicerol. Tebet et al, (2006) obtiveram 53% dos espermatozóides com membrana integra usando 7% de glicerol no meio. Independente das curvas de refrigeração e dos protocolos de congelação utilizados a concentração de glicerol talvez desempenhe um papel importante na integridade da membrana plasmática.

Tebet et al, 2006, obtiveram 23,1 +/- 13,9 de espermatozóides morfológicamente normais em sêmen pós-descongelado da cauda do epidídimo, valores inferiores aos encontrados em nossa pesquisa (61,8 +/- 8,82); estes autores sugeriram que a alta incidência de defeitos poderia ser consequência da utilização de solução fisiológica como primeiro diluente. Além disso o procedimento de eletroejaculação, prévio a colheita do sêmen da cauda do epidídimo, pode ter aumentado o número de formas imaturas presentes nas amostras.

Nossos resultados de morfologia espermática pós-descongelação foram superiores a 60% o que inclui a população de animais utilizados como normospérmica. A morfologia normal pós-extração, após a refrigeração e a descongelação, não apresentou diferenças significativas, demonstrando que o meio utilizado e as curvas de refrigeração foram competentes em manter a proporção de espermatozóides normais nas amostras.

Os resultados do presente experimento demonstraram que o eventual transporte de sêmen de gato doméstico refrigerado a 5^o C por 24 horas não altera a eficiência da congelabilidade do sêmen em comparação com a congelação imediata após a colheita. Os valores obtidos do sêmen pós-descongelação foram compatíveis com sua utilização futura, podendo essa técnica ser integrada a outras de reprodução assistida, como inseminação artificial, fertilização *in-vitro* (FIV) e injeção espermática intracitoplasmática (ICSI).

A capacidade de fertilização de espermatozóides descongelados foi demonstrada inicialmente por Platz et al, em 1976 quando descreveu uma taxa

de 10% de concepção, após inseminação artificial intra-vaginal com sêmen descongelado de gato doméstico.

Em 2000, Tsutsui et al. descreveu taxas de concepção de 57% resultante de IA intra-uterina, com sêmen refrigerado obtido da cauda do epidídimo. Tsutsui et al (2003) também obtiveram os primeiros filhotes de gatos domésticos a partir de IA intra-uterina com sêmen epididimário descongelado, com taxas de concepção de 27,3%.

Estudos conduzidos por Kashiwasaki et al, 2005 utilizando sêmen descongelado do epidídimo de gato doméstico, obtiveram uma motilidade e integridade de membrana de 31,8% e 32,2 % respectivamente e observaram uma taxa de 80% de ligação de espermatozóides em zona pelúcida de ovócito homólogo,

Bogliolo et al, (2001) utilizando sêmen descongelado do epidídimo, obtiveram 82% de taxa de clivagem e 7% de blastocisto, após a realização de ICSI, em ovócitos maturados *in-vitro*.

Esses estudos reforçam a possibilidade do uso de células espermáticas refrigeradas por um período prolongado, sem prejuízo da viabilidade pós-descongelação.

CONCLUSÃO

Após a análise dos resultados da presente pesquisa foi possível concluir que:

- A refrigeração prolongada não altera a viabilidade espermática pós-descongelação “in-vitro” de sêmen obtido da cauda do epidídimo de gatos domésticos.

REFERÊNCIAS

AMANN, R.P. Computerized evaluation of stallion spermatozoa. In: ANNUAL CONVENTION OF AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 33, 1987, Proceeding..., 1987, p.453.

ANZAR, M.; HASSAN, M.M.; GRAHAM, E.F.; DEYO, R.C.M. Efficacy of the Hamilton Torne motility analyzer (HTMA-2030) for the evaluation bovine semen. **Theriogenology**, v.36, p.307-317, 1991.

AUGER, J.; JOUANNET, P. Evidence for regional differences of semen quality among fertile French men. Federation Francaise des Centres d'Etude et de Conservation des Oeufs et du Sperme humains. **European Society for Human Reproduction and Embryology**, v.12, p.740-745, 1993.

AXNÉR, E.; STROM HOLST, B.; LINDE-FORSBERG, C. Morphology of spermatozoa in the cauda epididymidis before and after eletroejaculation and comparison with ejaculated spermatozoa in the domestic cat. **Theriogenology**. v. 50. p. 973-979, 1998.

AXNÉR, E.; LINDE-FORSBERG, C.; EINARSSON, S. Morphology and motility of spermatozoa from different regions of the epididimal ducts in the domestic cat. **Theriogenology**, v. 52, p. 767-778, 1999.

AXNÉR, E.; HERMANSSOM, U.; LINDE-FORSBERG, C. The effect of Equex STM paste and sperm morphology on post-thaw survival of cat epididymal spermatozoa. **Animal Reproduction Science**. v.84, p. 179-191, 2003.

AXNER, E.; HERMANSSON, U.; LINDE-FOSBERG, C. The effect of equex stm paste and sperm morphology on post-thaw survival of cat epididimal spermatozoa. **Animal Reproduction Science**. v.84, p.179-191, 2004.

AXNÉR, E.; LINDE-FOSBERG, C. Sêmen collection and assessment, and artificial insemination in cat. CONCANNON, P.W.; ENGLAND, G., VERTEGEN; J., LINDE-FOSBERG, J. Recent advances in small animal reproduction. Ithaca: **International Veterinary Information Service**. Disponível em <<http://www.ivis.org>>. Acesso em: Outubro 2005.

BARTH, A.D.; OKO, R.J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames: Iowa State University Press, 1989. 285p.

BALLOU, J.D. Potential contribution of cryopreserved germ plasm to the preservation of genetic diversity and conservation of endangered species in captivity. **Cryobiology**, v.29, p.19-25, 1992.

BARAN, A.; BACINOGLU, S.; EVECEN, M.; SAHIN, B.E.; ALCAN, S.; DEMIR, K.; Freezing of cat semen in straws with different glycerol levels containing Tris extender. **Turk Journal of Veterinary Animal Science**. v.28, p. 545-552, 2004.

BEDFORD, J.M. Morphological changes in rabbit spermatozoa during passage through the epididymis. **Journal of Reproduction and Fertility**. v.5, p.169-177, 1963.

BICUDO, S.D.; PASCHOAL, J.P. S.; RIBEIRO, E.F.R.; PAPA, F.O. Dispositivo de incubação para o resfriamento de sêmen em pequenos volumes. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal. **Anais da Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.2, p.456, 1991.

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

BUDWORTH, P.R.; AMANN, R.P.; CHAPMEN, P.L. Relationship between computerized measurements of motion of frozen-thawed bull spermatozoa and fertility. **Journal of Andrology**, v.9, p,41-43, 1988.

BUFF, S.; LAMBERT, V.; MARCHAL, T.; GUERIN, P. Isolation, culture and characteristics of epididymal epithelial cells from adult cats. **Theriogenology**, v.64, p.1603-1618, 2005.

BURKMAN, L.J. Characterization of hyperactivated motility by human spermatozoa during capacitation: comparison of fertile and oligozoospermic sperm populations. **Arch Androl**. v.13.p.153-65, 1984.

CITES(Convention on International Trade of Endangered Species of Wild Fauna and Flora). Apêndice I, II and III . Genebra. **CITES official website** (www.cites.org), 2005.

CRABO B.; GUSTAFSSON B.; NICANDER L.; RAO, A.R. Subnormal testicular function in a bull concealed by phagocytosis of abnormal spermatozoa in the efferent ductules .**Journal of Reproduction and Fertility.**, v.26, p.393-396, 1975.

DOOLEY , M.P.; PINEDA, M.H. Effects of methods of collection on seminal plasma characteristic of the domestic cat. **American .Journal of Veterinary Research.**, v.47, p. 286-292, 1986.

FARSTAD, W. Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.375-387, 2000.

GIL, J.; LUNDEHEIM, N.; SODERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MARTINES, H. Influence of extender, temperature and addition of glicerol on post-thaw sperm parametres in raw sêmen. **Theriogenology.** v.59, p. 1241-1255, 2003.

GOMEZ, M.C.; POPE, C.E.; GIRALDO, A.; LYONS, L.A.; HARRIS, R.F.; KING, A.L.; COLE, A.; GODKE, R.A.; DRESSER, B.L. Birth of African Wildcat cloned kittens born from domestic cats. **Cloning and Stem Cells.** v. 6, p. 247-258, 2004 (Abstr).

GLOVER, T.E.; WATSON, P.F. The effects of egg yolk, the low density lipoprotein fraction of egg yolk, and three monosaccharides on the survival of cat (*Felis catus*) spermatozoa Stored at +5^o C. **Animal Reproduction Science**. v. 13. p. 229-237, 1987.

GOODROWE, K.L. Feline reproduction and artificial breeding technologies. **Animal Reproduction Science**, v.28, p.389-397, 1992.

GOODROWE, K.L.; HAY, M.A. Characteristic and zona binding ability of fresh and colled domestic cat spermatozoa, **Theriogenology**, v.40, p.967-975, 1993.

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. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.39, p.73-90, 1989.

GURAYA, S.S. **Biology of spermatogenesis and spermatozoa in mammals**. Berlin, Springer-Verlag, Tese, 430p, 1987.

HAY, M.A.; GOODROWE, K.L. Comparative cryopreservation and capacitation of spermatozoa from epididymides and vasa deferent from domestic cat. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.47, p.297-395, 1993.

HARRIS, R.F.; GOMEZ, M.C.; LEIBO, S.P.; POPE, C.E. In vitro development of domestic cat embryos after in-vitro fertilization of oocytes with spermatozoa stored for various intervals at 4⁰ C, *Theriogenology*, v.57, p. 365, 2002 (Abstr).

HINGST, O.; BLOTTNER, S.; FRANZ, C. Chromatin condensation in cat spermatozoa during epididymal transit as studied by aniline blue staining and acridine orange staining. **Andrologia**, v.27, p.275-79, 1995.

HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage semen, **Animal Reproduction Science**, v.62, p. 3-22, 2000.

HOWARD, J.G.; BROWN, J.L., BUSH, M.; WILDT, E.D. Teratospermic and normospermic domestic cats: Ejaculate traits, pituitary-gonadal hormones, and improvement of spermatozoal motility and morphology after swim-up processing. **Journal of Andrology**, v.11, p.204-215, 1990.

HOWARD, J.G.; DONOGHUE, A.M.; JOHNSTON, L.A.; WILDT, D.E. Zona pelúcida filtration of structurally abnormal spermatozoa and reduced fertilization in teratospérmica cats. *Biology of Reproduction*, v.49, p. 131-139, 1993.

JASKO,D.J.; LITTLE, T.V.; LEIN, D.H.; FOOTE R.H., Comparison of spermatozoa movement and semen characteristic with fertility in stallions: 64 cases (1987-1988). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.200, p.979-985, 1992.

JASKO, D.J.; LITTLE, T.V.; SMITH, K.; LEIN, D,H;. FOOTE, R.H. Objective analysis of stallion sperm motility. **Theriogenology**, v.30, p.1159-1167, 1988.

JOHNSTON, S.D.; OSBORNE, C.A.; LIPOWITZ, A.J. Characterization of seminal plasma, prostatic fluid, and bulbourethral gland secretions in the domestic cat. In; **CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION**, , Dublin, Irlanda. v.11.p.26-30 1988.

JOHNSTON, S.D.; ROOT, M.V.; OLSON, P.N.S. Ovarian and testicular function in the domestic cat: clinical management of spontaneous reproductive disease. **Animal Reproduction Science**. v. 42, p.261-74, 1996

JOHNSTON, S.D.; KUSTRITZ, M.V.R.; OLSON, P.N.S. Section IV: The tom. In: **Canine and Feline Theriogenology**. Philadelphia: W.B. Saunders,. p.497-520, 2001.

KARJA, N.W.; OTOI, T.; MURAKAMI, M. FAHRUNDI, M. SUZUKI, T. In vitro maturation, fertilization and development of domestic cat oocytes recovered from ovaries colleted at three stages of the reproductive cicle. *Theriogenology*, v 57, p. 2289-2298, 2002a.

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

KASHIWASAKI, N.; YAMAGUCHI, R.; UESUGI, R.; HISHIYAMA, N.; KIM, M.; NAKATSUKASA, R.; KOJIMA, Y.; OKUDA, Y.; HISAMATSU, S.; INOMATA, T.; SHINO, M. Sperm motility, plasma membrane Integrity, and binding capacity to homologous zona pellucida of cryopreserved epididymal spermatozoa in the domestic cat. **Journal of Reproduction and Development**. v. 51. p.735-739. 2005.

KELLY, J.W.; HURST, V. Relationship between certain laboratory criteria and fertility bovine semen. **American Journal of Veterinary Research**, v.24, p.136-138, 1963.

KENNEY, R.M.; KINGSTONE, R.S.; RAJAMENNAN, A.A.J.; RAMBERG, C.F. Stallion semen characteristics for predicting fertility. In: **ANNUAL CONVENTION OF AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS**, v.17, p.230. 1971,

KRAUSE, D. **Untersuchungen am bullensperma unter berücksichtigung der fertilitäts diagnostischen bedeutung der befunde**. Hannover,. 165p. Tese (Livro Docência) – Tierärztliche Hochschule, Hannover, 1966.

LEIPOLD, S.D.; GRAHAM, J.K.; SQUIRES, E.L.; McCUE, P.M. BRINSKO; S.P. e VANDERWALL, D.K. Effect of spermatozoa concentration and number on fertility of frozen equine semen. **Theriogenology**, v.49, p. 1537-1543, 1998.

LENGWINAT, T.; BLOTTNER, S. In vitro fertilization of follicular oocytes of domestic cat using fresh and cryopreserved epididymal spermatozoa. **Animal Reproduction Science**; v.35; p.291-301; 1994.

LINDFORD; E.; GLOVER; F.A.; BISHOP; C.; STEWART, D.L. The relationship between semen evaluation methods and fertility in the bull. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.47, p.876-880, 1988.

LUVONI, G.C.; KALCHSCHMIDT, E.; LEONI, S.; RUGGIERO, C. Conservation of Feline sêmen part I: cooling and freezing protocols – review. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. v. 5, p.203-208, 2003a.

LUVONI, G.C.; KALCHSCHMIDT, E.; MARINONI, G. Conservation of feline sêmen part II: cold-induced damages on spermatozoa fertilizing ability – Review. . **Journal of Feline Medicine and Surgery**. v. 5 , p. 257-263. 2003b.

LUVONI, G.C.; RUGGIERO, C.; MARINONI, G.; KALCHSCHMIDT, E. Effect of taurina-containing diluente for cryopreservation of domestic cat spermatozoa (Abstr). **Theriogenology**, v.57, p.466, 2002.

MAHADEVAN, M.M.; TROUNSON, A.O.; WOOD, C.; LEETON, J.F. Effect of oocyte quality and sperm characteristics on the number of spermatozoa bound to the zona pellucida of human oocytes inseminated in vitro..**Journal In Vitro Fert Embryo Transfer**. v.4. p.223-227, 1987.

MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. **Male reproductive function and semen**. Berlin, Springer-Verlag, 1981. 495p.

MARTINS, M.I.M.; SOUZA, F.F.; LOPES, M.D. Eletroforese das proteínas do fluído epididimal canino: dados preliminares. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, p.72-75, 2002.

MAZUR, P.; KOSHIMOTO, C. Is intracellular ice formation the cause of death of mouse sperm frozen at high cooling rates? **Biology of Reproduction**, v.66, p.1485-1490, 2002.

MEDRANO, A.; WATSON, P.F.; HOLT, W.V. Importance of cooling rate and animal variability for boar semen cryopreservation: Insights for the cryomicroscope. **Reproduction**, v.123, p.315-322, 2002.

MÉTAYER, S.; DACHEUX, F.; DACHEUX, J.L. Comparison, characterization, and identification of proteases and protease inhibitors in epididymal fluids of domestic mammals, matrix metalloproteinases are major fluid gelatinases. **Biology of Reproduction**, v.66, p.1219-1229, 2002.

MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais e inseminação artificial, inseminação artificial nos cães**. 6.ed. Porto Alegre: Sulina, 1987. 750p.

MOORE, H.D.M.; HARTMAN, T.D.; PRYOR, J.P. Development of the oocyte penetrating capacity of spermatozoa in the human epididymis. **International Journal of Andrology**, v.6, p.310-18, 1983.

MULLER, C.H. Rationale, interpretation, validation, and uses of sperm function test. review, **Journal of Andrology**, v.21, p.10-30, 2000.

MOILES, E.E., THOMPSON, K.A.; STOREY, B.T. Water permability, L-p, oof the mouse sperm and its activation energy are strongly dependent on interaction of the plasma membrane with the spem cytoskeleton. **Cryobiology**, v.35, p.79-92, 1997.

NOWELL, P.; JACKSON, P. Status survey and conservation action plan. **Wild cats. Gland: IUCN**, Suiça, 1996, p.149-179,.

PICKETT, B.W.; MACDONALD, W.A.; GOSLEE, D.G.; COWAN, W.A., Correlation between certain laboratory stress test and fertility of frozen bovine semen . **Journal of Dairy Science**, v.44., p. 1134-1140, 1988.

PLATZ Jr., C.C.; FOLLIS, T.; DEMOREST, N.; SEAGER, S. Semen collection, freezing and insemination in the domestic cat. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 8., Cracow, 1976. p.1053-1055.

PLATZ Jr., C.C.; SEAGER, W.J. Semen collection by electroejaculation in the domestic cat. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.173, n.10, p.1353-5, 1978.

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

POPE, C.E.; ZHANG, Y.Z.; DRESSER, B.L. A simple staining method for evaluating acrossomal status of cat spermatozoa. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**; v.22, p.87-95, 1991.

POPE, C.E.; GELWICKS, E.J.; WACHS, K.B.; DRESSER, B.L. In-vitro fertilization in the domestic cat (*Felis catus*) a comparison between freshly collected and cooled semen. (Abstr act) **Theriogenology**, v.31, p.241, 1989.

PUKAZHENTHI, B.; PELICAM, , K.; WILDT, D.E.; HOWARD, J.G., Sensitivity of domestic cat (*Felis catus*) sperm from normospermic versus teratospermic donors to cold-induced acrossomal damage. **Biology of Reproduction**, v.61, p.135-141, 1999.

PUKAZHENTHI, B.; SPINDLER, R.; WILDT, D. E.; MAY BUSH, L.; HOWARD, J. Osmotic properties of spermatozoa from felids producing different proportions of pleiomorphism: Influence of adding and removing cryoprotectant. **Cryobiology**, v. 44, p. 288-300, 2001.

PUKAZHENTHI, B.S.; NEUBAUER, K.; JEWGWNOW, K.; HOWARD, J.; WILDT, D.E The impact and potential etiology of teratospermia in the domestic cat and its wild relatives. *Theriogenology*. 2006 In-press.

SANKAI, T.; TSUCHIYA, N.; OGONUKI, N. Short-term nonfrozen storage of mouse epididimal spermatozoa. **Theriogenology**, v.55, p.1759-1768, 2001.

SEAGER, S.W.J.; PLATZ Jr., C.C. Semen collection and freezing in captive wild mammals. In: INTERNATIONAL

CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 8.**Cracow,1976**,p.1075-7.

SCHAFER, J.J.; HOLZMANN, A. The use of transmigration and SpermacTM stain to evaluate epididymal cat spermatozoa, *Animal Reproduction Science*, v. 59, p. 201-211, 2000.

SOJKA, N.J.; JENNINGS, L.L.; HAMNER, C.E. Artificial insemination in the cat (*Felis catus*). **Laboratory of Animal Care**, v.20, p.198-204, 1971.

STACHECKI, J.J.; GINSBURG, K.A.; ARMANT, D.R. Stimulation of cryopreserved epididymal spermatozoa of the domestic cat using the motility stimulants caffeine, pentoxifylline, and 2'-deoxyadenosine. **Journal of Andrology** v.15, p.157-64, 1994.

STACHECKI, J.J.; GINSBURG, K.A.; LEACH, R.E.; ARMANT, D.R. Computer-assisted semen analysis (CASA) of epididymal sperm from the domestic cat.. **Journal of Andrology**, v.14, p.60-65, 1993.

SWANSON, W.F.; BROWN, J.L.; WILDT, D.E. Influence of seasonality on reproductive traits of the male pallas'cat (*Felis manul*) and implications for captive management. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.27, n.2, p.234-40,1996.

SWANSON, W.F.; WILDT, D.E. Strategies and progress in reproductive research involving small cat species. **International Zoo Yearbook**, v.35, p.152-159, 1997.

SWANSON, W.F.; JOHNSON, W.E.; CAMBRE, R.C.; CITINO S.B., QUIGLEY; K.B.; BROUSSET, D.M.; MORAIS, R.N.; MOREIRA, N.; O'BRIEN S.J., WILDT, D.E. Reproductive status of endemic felid species in Latin American zoos and implications for ex situ conservation. **ZoxxBiology**, v.22, p.421-441, 2003.

SWANSON, W.F. Aplication of assisted reproduction for population management in felids: The potential and reality for conservation of small cats, *Theriogenology*, 2006. In-press.

TANAKA, A.; KUWABARA, S.; TAKAGI, Y.; NAKAGAWA, K.; FUJIMOTO, Y.; MURAI, M.; TSUTSUI, T. Effect os eletroejaculation interval on semen quality in cats. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 62, p. 1157-1161, 2000.

TEBET, J. M.; MARTINS, M.I.M.; CHIRINEA, V.H.; SOUZA, F.F.; CAMPAGNOL, D.; LOPES, M.D. Cryopreservation effects on domestic cat epididymal versus eletroejuaculated spermatozoa. **Theriogenology**, 2006 in-press.

TSUTSUI, T.; TANAKA, A.; NAKAGAWA, K.; FUGIMOTO, Y.; MURAI, M.; ANZAI, M.; HORI, T. Unilateral intrauterine born insemination of frozen sêmen in cats. **Journal of Veterinary Medicine**. v.62, p. 1247-1251, 2000.

TSUTSUI, T.; WADA, M.; ANZAI, M.; HORI, T.; Artificial Insemination with frozen epididymal sperm in cats. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 65, p. 397-399, 2003.

TSUTSUI, T.; KUWABARA, S.; KUWABARA, K.; KUGOTA, Y.; KINJO, T.; HORI, T. Development of spermatogenic function in the sex maturation process in male cats. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v 66, p. 1125-1127, 2004.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice, **Theriogenology**, v.57, p.149-79, 2002.

VILLAYERDE, A.I.S.B.; LOPES, M.D.; MARTINS, M.I.M.; CASTRO, V.B.; TRINCA, L.A. Avaliação de sêmen refrigerado obtido do epidídimo de gatos domésticos (*Felis catus*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**; v 28, n.3, p. 170-173. 2004.

WALKER, J.S.; WINET, H.; FREUND, M. A comparison of subjective and objective sperm motility evaluation. **Journal of Andrology**, v.3, p. 184-192, 1982.

WATSON, P.F. Artificial insemination and the preservation of semen. In: **Marshall's physiology of reproduction**. 4. ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1990, v.2, p.747-869.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 481-492, 2000.

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.161-84, 1992.

WILDT, D.E.; SEAL, U.S.; RALL, W.F. Genetic Resource banks and reproductive technology for wildlife conservation In Genetic Conservation of Salmonid fishes. Plenum Publish Cooperation, Nova York, v.1, p. 159, 173, 1993.

WILDT, D.E.; BROWN, J.L.; BUSH, M.; BARONE, M.A.; COOPER, K.A.; GRISHAM, J.; HOWARD, J.G. Reproductive status of cheetahs (*Acinonyx jubatus*) in north american zoos: the benefits of physiological surveys for strategic planning. **Zoo Biology**, v.12, p.45-80, 1993.

WILDT, D.; PUKAZHENTHI, B.; BROWN, J.; MONFORT, S.; HOWARD, J.; ROTH, T. Spermatology for understanding, managing and conserving rare species. **Reproduction and Fertility and Development**, v.7, p.811-824, 1995.

WILDT, D.; ROTH, T.L. Assisted reproduction for managing and conserving threatened felids. **International Zoo. Yearbook**. v.35. p. 164-172, 1997.

YU, I.; LEIBO, S.P. Recovery of motile, membrane-intact spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4°C. **Theriogenology**, v.57, p.1179-90, 2002.

ZAMBELLI, D.; CANEPPELE, C.; CASTAGNETTI, C.; BELLUZZI, S. Cryopreservation of cat semen in straws: comparison of five different freezing rates. **Reproduction of Domestic Animal**, v.37, p.310-313, 2002.

ZAMBELLI, D.; CUNTO, M. Semen collection in cats: techniques and analysis. **Theriogenology**, 2006.in-press.

Resumo

MARTINS, J.L.A. **Criopreservação de sêmen da cauda dop epidídimo de gatos domésticos (felis catus) após refrigeração por 24.** Botucatu, 2006. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária , Área de Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, UNESP.

A análise dos efeitos da refrigeração sobre a congelabilidade da célula espermática da cauda do epidídimo de gatos domésticos foram avaliados nesse experimento. Após prévia refrigeração a 5^o C por 24 horas alíquotas de sêmen foram submetidas a criopreservação e posteriormente descongeladas para análise morfofuncional. 15 animais foram submetidos a orquiectomia de conveniência e seus epidídimos foram manipulados para obtenção de amostras que foram suspensas em meio TE (TRIS/Equex/Gema de Ovo), analisadas, refrigeradas e congeladas. Amostras referentes ao grupo controle foram congeladas imediatamente após a colheita. A análise morfofuncional consistiu em motilidade, vigor, morfologia espermática e Integridade de membrana. Após a descongelação os resultados dos grupos controle e trabalho foram analisados estatisticamente e observou-se que não existe diferença estatística para nenhuma das variáveis analisadas. Embora tenha sido observada diferença

estatística entre os momentos pós-colheita e pós-refrigeração por 24 horas para as variáveis motilidade, vigor, integridade de membrana e defeitos primários, nenhuma variável diferiu entre as amostras congeladas pós-colheita e as amostras congeladas pós-refrigeração prolongada. Tais resultados demonstram que um transporte refrigerado a 5° C por 24 horas não interfere sobre a congelabilidade de sêmen do epidídimo de gatos domésticos. Do ponto de vista da conservação tais resultados abrem portas para um melhor fluxo de gametas de espécies selvagens para centrais de biotecnologia permitindo um melhor aproveitamento e conservação deste material.

Palavras Chaves: Refrigeração, Congelação de Sêmen, Epidídimo, Gato Doméstico, transporte de sêmen.