

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

JUSSARA MARIA TEBET

**EFEITO DA CRIOPRESERVAÇÃO SOBRE A CÉLULA ESPERMÁTICA
EM TRÊS ESPÉCIES DE FELINOS: O GATO-DO-MATO-PEQUENO**
(*Leopardus tigrinus* – Schreber, 1775), **A JAGUATIRICA** (*Leopardus
pardalis* – Linnaeus, 1758) **E O GATO DOMÉSTICO** (*Felis catus*)

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”-
Campus de Botucatu, para a obtenção do
título de Doutor em Reprodução Animal.

Orientadora: Prof.^a Adj. Maria Denise Lopes

BOTUCATU

2004

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO

DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Tebet, Jussara Maria.

Efeitos da criopreservação sobre a célula espermática em três espécies de felinos : o gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus* – Schreber, 1775), a jaguatirica (*Leopardus pardalis*- Linnaeus, 1758) e o gato doméstico (*Felis catus*) / Jussara Maria Tebet. – 2004.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2004.

Orientadora: Maria Denise Lopes

Assunto CAPES: 50504002

1. Reprodução animal

CDD 636.0824

Palavras-chave: Criopreservação; Gato doméstico; *Leopardos pardalis*; *Leopardus tigrinus*; Sêmen

*Aos homens que compartilham a vida comigo,
Rogério e Rodrigo,
que estão sempre a me lembrar o quanto a vida é
intensa.*

*Aos meus amados pais,
Neusa e Gilberto,
que me ensinaram a lutar por meus ideais.*

*Ao "Destino" que, por muitos motivos, uniu
todos nós.*

AGRADECIMENTOS

À professora Maria Denise Lopes, que viabilizou esta tese, pela orientação, exigência e disponibilidade, pela dedicação incansável e por todos os ensinamentos repletos de experiência.

Aos meus pais, Neusa e Gilberto e à minha sogra, Rose, porque cheios de amor cuidaram do Rodrigo para que eu pudesse realizar este ideal.

Às minhas amigas queridas, Maria Izabel M. Martins, Viviane H. Chirinéa e Fabiana F. Souza, a equipe que me auxiliou neste trabalho, sob chuva ou sol.

À professora Mariângela Lozano Cruz e às meninas da Anestesiologia, Dani, Carol, Suzane, Raquel e Vanessa, que foram responsáveis pela elaboração dos protocolos e pela execução da anestesia nos animais.

À Associação Mata Ciliar, em especial à amiga Cristina Harumi Adania e sua equipe Melissa Sansone Cruz Mauro e Cláudia Yumi Hashimoto, que dedicaram tempo e disposição para realizar nossas colheitas de material.

Ao pós-graduando Cláudio Mattoso, que realizou hemogramas para auxiliar o diagnóstico do estado clínico dos animais durante o experimento.

Ao professor Carlos Roberto Padovani, pela disponibilidade e atenção, e pela realização dos cálculos estatísticos.

Ao professor Frederico Ozanan Papa, por ceder o diluidor MP-50 e por auxiliar na confecção do meio TRIS-Equex, além de sanar muitas dúvidas que surgiram durante as análises do material.

Ao professor Sony Dimas Bicudo, pela amizade e pelo interesse em ajudar a interpretar alguns dados.

À colega Claudinha, pelo socorro em horas difíceis.

Ao Edílson, ao Marquinho e, especialmente ao Walter e à Cristina, funcionários e colegas do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, que sempre com presteza estiveram dispostos a auxiliar.

À Denise, Maria e Carmen, funcionárias da Pós-Graduação, sempre com bom humor, cuidando de todos nós.

Ao Sr. Luiz e ao Sr. João, que cuidaram dos gatos que participaram do projeto piloto deste experimento.

À amiga e chefe Maria Batista Varoto, pelo incentivo e carinho sempre dispensados.

Aos amigos, Ilda, Ana Maria, Regina, Marco Antônio, Natal e Karin, pelo incentivo.

Aos meus irmãos de sangue, Iberê, Iara e Jacira e aos que a vida me presenteou, Lisiane, André, Ilda e Ana, pela amizade, companheirismo e incentivo.

A todas as pessoas que repartiram comigo a convivência na FMVZ durante estes anos e que compartilharam comigo os sonhos e as dificuldades.

À FAPESP e ao CNPq, pelo apoio financeiro, tornando viável esta tese.

**"Tudo passa - sofrimento, dor,
sangue, fome, peste. A espada
também passará, mas as estrelas
ainda permanecerão quando as
sombras de nossa presença e de
nossos feitos se tiverem
desvanecido da Terra. Não há
homem que não saiba disso. Por
que então não voltarmos nossos**

SUMÁRIO

Lista de Tabelas	a
Lista de Figuras	b
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO DE LITERATURA	3
1. Aspectos Gerais da Criopreservação do Sêmen	3
2. A Família e as Espécies	12
Fisiologia Reprodutiva	13
Colheita de Sêmen	18
Criopreservação do sêmen felino	19
<i>EXPERIMENTO I</i>	
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
MATERIAL E MÉTODO	26
1. Local do Experimento	26

2. Animais	27
3. Contenção Farmacológica.....	28
4.Exame Andrológico	29
4.1 Avaliação da genitália externa	29
4.2 Colheita de sêmen.....	29
4.3 Avaliações do sêmen <i>in natura</i>	32
5. Criopreservação do Sêmen.....	34
5.1 Técnica de congelação e diluentes.....	34
5.2 Análises do sêmen pós-descongelação	36
6. Análise Ultraestrutural.....	37
7. Análise Estatística	38
RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
1. Considerações Iniciais	40
2. Tigrina	42
3. Jaguatirica	55
4. Análise Ultraestrutural.....	66
5. Discussão Geral.....	70
 <i>EXPERIMENTO II</i>	
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	75
MATERIAL E MÉTODO	76
1. Local do Experimento	76
2. Animais	76
3. Contenção Farmacológica.....	77

4.Exame Andrológico	77
4.1 Avaliação da genitália externa	77
4.2 Colheita de sêmen.....	77
4.3 Avaliações do sêmen.....	78
5. Criopreservação do Sêmen.....	79
6. Análise Estatística	80
RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
Análise Ultraestrutural.....	95
Discussão Geral.....	97
CONCLUSÕES	99
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
RESUMO	115
<i>ABSTRACT</i>	116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Peso corporal, volume testicular e características seminais em valores médios ($\pm$ erro padrão) de <i>Leopardus tigrinus</i> (tigrina) obtidos em duas fontes*. (número de ejaculados do estudo).	15
Tabela 2.	Peso corporal, volume testicular e características seminais em valores médios ($\pm$ erro padrão) de <i>Leopardus pardalis</i> (jaguatirica) obtidos em três fontes*. (número de ejaculados do estudo).	16
Tabela 3.	Protocolo de estímulos para eletroejaculação proposto para carnívoros (Howard, 1993).	18
Tabela 4.	Origem, idade estimada (anos), histórico de reprodução em cativeiro (nº de vezes) das cinco tigrinas (<i>L. tigrinus</i>) e cinco jaguatiricas (<i>Leopardus pardalis</i>) que integraram este estudo, Botucatu, 2004.	27
Tabela 5.	Fármacos utilizados para contenção de <i>Leopardus pardalis</i> e <i>L. tigrinus</i> , nome comercial, concentração, dose e via de administração, Botucatu, 2004.	28
Tabela 6.	Composição da solução hiposmótica (150 mOsm/kg), Botucatu, 2004.	33
Tabela 7.	Composição dos diluentes TRIS EQUEx (~ 330 mOsm/kg) e TRIS EQUEx GLICEROL utilizados respectivamente para a lavagem e congelamento do sêmen de <i>Leopardus pardalis</i> e <i>L. tigrinus</i> , Botucatu, 2004.	35
Tabela 8.	Composição simplificada do diluidor MP-50: componentes (Papa <i>et al.</i> , 2002), Botucatu, 2004.	35

Tabela 9.	Composição da solução-trabalho utilizada para o teste de coloração de sondas fluorescentes e composição das soluções-estoque destinadas ao preparo da solução-trabalho, Botucatu, 2004.	36
Tabela 10.	Médias ($\pm$ DP) de peso corporal (PC), volume testicular total (VTT), volume do ejaculado (VOL), pH e concentração espermática (C) dos 15 ejaculados obtidos em cinco espécimes de <i>Leopardus tigrinus</i> , Botucatu, 2004.	43
Tabela 11.	Valores médios ($\pm$ DP) das análises do sêmen <i>in natura</i> e pós-descongelado nos diluentes TRIS-EQUEX-GLICEROL (TRIS) e MP-50 para <i>Leopardus tigrinus</i> (n=5, 15 ejaculados); sendo: motilidade espermática (Mot), vigor espermático (V), teste hiposmótico (H), sondas fluorescentes (F), espermatozóides morfolologicamente normais (N), Botucatu, 2004.	45
Tabela 12.	Médias ($\pm$ DP) das porcentagens de espermatozóides morfolologicamente normais e de espermatozóides pleiomórficos no sêmen <i>in natura</i> e pós-descongelado nos diluentes TRIS-EQUEX-GLICEROL e MP-50 em <i>Leopardus tigrinus</i> (n=5, 15 ejaculados), Botucatu, 2004.	47
Tabela 13.	Medidas descritivas para a motilidade espermática de <i>Leopardus tigrinus</i> , segundo a variação relativa (%) dos momentos <i>in natura</i> e pós-descongelado, nos diluentes TRIS EQUEX GLICEROL e MP-50, Botucatu, 2004.	48
Tabela 14.	Medidas descritivas para o vigor espermático de <i>Leopardus tigrinus</i> , segundo a variação relativa (%) dos momentos <i>in natura</i> e pós-descongelado, nos diluentes TRIS EQUEX GLICEROL e MP-50, Botucatu, 2004.	49
Tabela 15.	Medidas descritivas para a morfologia espermática – espermatozóides normais - de <i>Leopardus tigrinus</i> , segundo a variação relativa (%) dos momentos <i>in natura</i> e pós-descongelado, nos diluentes TRIS EQUEX GLICEROL e MP-50, Botucatu, 2004.	50

Tabela 16.	Medidas descritivas para a morfologia espermática – defeitos menores - de <i>Leopardus tigrinus</i> , segundo a queda relativa (%) dos momentos <i>in natura</i> e pós-descongelado, nos diluentes TRIS EQUEX GLICEROL e MP-50, Botucatu, 2004.	50
Tabela 17.	Medidas descritivas para a morfologia espermática – defeitos maiores - de <i>Leopardus tigrinus</i> , segundo a variação relativa (%) dos momentos <i>in natura</i> e pós-descongelado, nos diluentes TRIS EQUEX GLICEROL e MP-50, Botucatu, 2004.	50
Tabela 18.	Medidas descritivas para o teste hiposmótico de sêmen de <i>Leopardus tigrinus</i> , segundo a queda relativa (%) após o processo de criopreservação, nos diluentes TRIS EQUEX GLICEROL e MP-50, Botucatu, 2004.	53
Tabela 19.	Medidas descritivas para a integridade de membrana por sondas fluorescentes de <i>Leopardus tigrinus</i> , segundo a porcentagem (%) obtida após o processo de criopreservação de sêmen nos diluentes TRIS EQUEX GLICEROL e MP-50, Botucatu, 2004.	54
Tabela 20.	Médias ($\pm$ DP) de peso corporal (PC), volume testicular total (VTT), volume do ejaculado (VOL), pH e concentração espermática (C) para cinco espécimes de <i>Leopardus pardalis</i> , Botucatu, 2004.	56
Tabela 21.	Valores médios ($\pm$ DP) das análises do sêmen <i>in natura</i> e pós-descongelado nos meios TRIS-EQUEX-GLICEROL (TRIS) e MP-50 para <i>Leopardus pardalis</i> (n=5, 17 ejaculados); sendo: motilidade espermática (Mot), vigor espermático (V), teste hiposmótico (H), sondas fluorescentes (F), espermatozóides morfolologicamente normais (N), Botucatu, 2004.	58
Tabela 22.	Médias ($\pm$ DP) das porcentagens de espermatozóides morfolologicamente normais e de espermatozóides pleiomórficos no sêmen <i>in natura</i> e após a congelção em meio TRIS-EQUEX-GLICEROL e MP-50, em <i>Leopardus pardalis</i> (n=5, 17 ejaculados), Botucatu, 2004.	59

Tabela 23.	Medidas descritivas para a motilidade espermática de <i>Leopardus pardalis</i> , segundo a variação relativa (%) dos momentos <i>in natura</i> e pós-descongelado, nos diluentes TRIS EQUEX GLICEROL e MP-50, Botucatu, 2004.	60
Tabela 24.	Medidas descritivas para o vigor espermático de <i>Leopardus pardalis</i> , segundo a variação relativa (%) dos momentos <i>in natura</i> e pós-descongelado, nos diluentes TRIS EQUEX GLICEROL e MP-50, Botucatu, 2004.	60
Tabela 25.	Medidas descritivas para o teste hiposmótico de <i>Leopardus pardalis</i> , segundo a variação relativa (%) dos momentos <i>in natura</i> e pós-descongelado, nos diluentes TRIS EQUEX GLICEROL e MP-50, Botucatu, 2004.	61
Tabela 26.	Medidas descritivas para a integridade de membrana por sondas fluorescentes de sêmen de <i>Leopardus pardalis</i> , segundo a porcentagem (%) obtida após a criopreservação nos diluentes TRIS EQUEX GLICEROL e MP-50, Botucatu, 2004.	62
Tabela 27.	Medidas descritivas para a morfologia espermática – espermatozóides normais - de <i>Leopardus pardalis</i> , segundo a variação relativa (%) dos momentos <i>in natura</i> e pós-descongelado, nos diluentes TRIS EQUEX GLICEROL e MP-50, Botucatu, 2004.	64
Tabela 28.	Medidas descritivas para a morfologia espermática – defeitos menores - de <i>Leopardus pardalis</i> , segundo a variação relativa (%) dos momentos <i>in natura</i> e pós-descongelado, nos diluentes TRIS EQUEX GLICEROL e MP-50, Botucatu, 2004.	64
Tabela 29.	Medidas descritivas para a morfologia espermática – defeitos maiores - de <i>Leopardus pardalis</i> , segundo a variação relativa (%) dos momentos <i>in natura</i> e pós-descongelado, nos diluentes TRIS EQUEX GLICEROL e MP-50, Botucatu, 2004.	64

Tabela 30.	Idade (ID), peso corporal (PC), volume testicular total (VTT) e corrigido para o peso corporal (VTT/PC) para dez gatos domésticos, e a média final para os valores obtidos, Botucatu, 2004.	83
Tabela 31.	Médias obtidas para as características do sêmen proveniente de eletroejaculação e subsequente colheita do epidídimo em dez gatos domésticos, Botucatu, 2004.	84
Tabela 32.	Valores médios ($\pm$ DP) para a morfologia espermática em gato doméstico (n=10), utilizando-se duas técnicas de colheita de sêmen, eletroejaculação e colheita do epidídimo, em dois momentos, antes e após a criopreservação. (Botucatu, 2004)	86
Tabela 33	Médias de motilidade espermática, vigor espermático, espermatozóides morfologicamente normais e integridade de membrana por sondas fluorescentes obtidas para o sêmen descongelado de gato doméstico (n=10), colhido por eletroejaculação e da cauda do epidídimo e criopreservados utilizando-se a mesma metodologia, Botucatu, 2004.	89
Tabela 34.	Medidas descritivas para a motilidade espermática do sêmen de gato doméstico obtido pela colheita por eletroejaculação e do epidídimo, segundo a variação relativa (%) dos momentos <i>in natura</i> e pós-criopreservação, Botucatu, 2004.	89
Tabela 35.	Medidas descritivas para o vigor espermático do sêmen de gato doméstico obtido pela colheita por eletroejaculação e do epidídimo, segundo a variação relativa (%) dos momentos <i>in natura</i> e pós-criopreservação, Botucatu, 2004.	90
Tabela 36.	Medidas descritivas para integridade de membrana do sêmen de gato doméstico obtido pela colheita por eletroejaculação e do epidídimo, segundo a variação relativa (%) dos momentos <i>in natura</i> e pós-criopreservação, Botucatu, 2004.	91

Tabela 37.	Medidas descritivas para morfologia do sêmen de gato doméstico (espermatozóides normais) obtido pela colheita por eletroejaculação e do epidídimo, segundo a variação relativa (%) dos momentos <i>in natura</i> e pós-criopreservação, Botucatu, 2004.	92
Tabela 38.	Medidas descritivas para morfologia do sêmen de gato doméstico (defeitos menores) obtido pela colheita por eletroejaculação e do epidídimo, segundo a variação relativa (%) dos momentos <i>in natura</i> e pós-criopreservação, Botucatu, 2004.	92
Tabela 39.	Medidas descritivas para morfologia do sêmen de gato doméstico (defeitos maiores) obtido pela colheita por eletroejaculação e do epidídimo, segundo a variação relativa (%) dos momentos <i>in natura</i> e pós-criopreservação, Botucatu, 2004.	94

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Detalhe do eletroejaculador (Eletrovét [®] , São Paulo) e frasco coletor, em colheita de sêmen em jaguatirica (<i>Leopardus pardalis</i>), Botucatu, 2004.	30
Figura 2.	Pênis de <i>Leopardus pardalis</i> evidenciando a glândula. Em detalhe o aumento de volume na porção apical, Botucatu, 2004.	40
Figura 3.	Colheita de sêmen por eletroejaculação em <i>Leopardus pardalis</i> : observar o posicionamento simétrico dos membros pélvicos em sentido caudal em resposta ao estímulo elétrico, Botucatu, 2004.	41
Figura 4	Representação gráfica dos resultados obtidos na análise da morfologia espermática de <i>Leopardus tigrinus</i> nos momentos <i>in natura</i> (A) e após a criopreservação (B). (médias dos resultados obtidos utilizando-se os diluidores TRIS-EQUEx-GLICEROL e MP-50), Botucatu, 2004.	51
Figura 5.	Morfologia espermática em sêmen <i>in natura</i> (IN) ou criopreservado (C) de <i>Leopardus tigrinus</i> , utilizando-se a coloração simples de “Pope”, em microscopia óptica, 1000x. 4a) Espermatozóide normal (IN). 4b) Espermatozóide com defeito de peça intermediária (dobrada) (IN). 4c) Cauda enrolada (IN). 4d) Cauda dobrada e acrossomo intacto (C). 4e ¹) Contorno anormal de acrossomo, embora esteja presente (C) e 4e ²) cauda dobrada e presença parcial de acrossomo (C), Botucatu, 2004.	52
Figura 6.	Representação gráfica dos resultados obtidos na análise da morfologia espermática de <i>Leopardus pardalis</i> nos momentos <i>in natura</i> (A) e após a criopreservação (B) (médias dos resultados obtidos utilizando-se os diluidores TRIS-EQUEx-GLICEROL e MP-50), Botucatu, 2004.	63

- Figura 7. Morfologia espermática em sêmen *in natura* (IN) ou criopreservado (C) de *Leopardus pardalis*, utilizando-se a coloração simples de “Pope”, em microscopia óptica, 1000x. 6a) Espermatozóide normal (IN), cabeça (C), peça intermediária (PI) e cauda ou flagelo (F). 6b) Espermatozóide com cauda dobrada (C). 6c) Peça intermediária dobrada (C). 6d) Defeito de peça intermediária (bainha mitocondrial) e ausência de acrossomo (C), Botucatu, 2004. 65
- Figura 8. Ultraestrutura espermática de *Leopardus tigrinus* nos momentos *in natura* (IN) e após a criopreservação (C). a) Espermatozóide com integridade acrossomal e homogeneidade de núcleo (N) (IN) (31500x); b¹) espermatozóide mostrando distensão de membrana plasmática (MP) e acrossomal externa (MAE), porém com integridade de acrossomo b²). vesiculação (VES) das membranas plasmática e acrossomal externa (C) (21200x); c) defeito de acrossomo “knobbed” (flexa cheia) e irregularidade de acrossomo (flexa tracejada) (IN) (41200x); d) distensão de membrana acrossomal externa e heterogeneidade de conteúdo, sem perda da integridade acrossomal (C) (57500x); e) vesiculação da membrana acrossomal externa e destacamento da membrana acrossomal interna (MAI) (C) (41200x), Botucatu, 2004. 68
- Figura 9. Ultraestrutura espermática de *Leopardus pardalis*, nos momentos *in natura* (IN) e criopreservado (C). a) Espermatozóide com integridade de membrana plasmática e de acrossomo (IN) (23000x); b) início de vesiculação acrossômica (V), membrana plasmática (MP) fragmentada, descontinuidade de acrossomo (flexa) (C) (42000x); c) fusão e vesiculação de membrana plasmática e acrossomal externa (MAE), membrana acrossomal interna (MAI) aderida à membrana nuclear (C) (31500x); Botucatu, 2004. 69
- Figura 10. Ilustração do formato cônico da glândula do pênis do gato doméstico, diferindo do formato da glândula da jaguatirica (*Leopardus pardalis*) e do tigrino (*L. tigrinus*), Botucatu, 2004. 82

Figura 11.	Representação gráfica dos dados em morfologia espermática do sêmen de gato doméstico obtido por duas técnicas de colheita, eletroejaculação (A) e do epidídimo (B), nos momentos <i>in natura</i> (1) e pós-descongelamento (2), Botucatu, 2004.	90
Figura 12.	Morfologia espermática utilizando-se coloração simples de “Pope” para sêmen <i>in natura</i> e descongelado de gato doméstico, proveniente de duas técnicas de colheita, a eletroejaculação (EL) e a colheita do epidídimo e ducto deferente (EP). a) espermatozóide normal <i>in natura</i> ; b) cauda enrolada e alteração de colo em sêmen descongelado (EL); c) gota citoplasmática distal em sêmen descongelado (EP); d) ausência de acrossomo em sêmen descongelado (EL); e) cabeça dupla em sêmen descongelado (EL); f) protrusão de acrossomo em sêmen descongelado (EL), Botucatu, 2004.	93
Figura 13.	Ultraestrutura espermática do sêmen descongelado de gato doméstico, oriundo de eletroejaculação (EL) e da colheita do epidídimo e vaso deferente de gato doméstico (EP). a) espermatozóide mostrando distensão de membrana acrossomal externa (MAE), alteração de conteúdo e membrana acrossomal interna (MAI) aderida ao núcleo (EL) (42000x); b) vesiculação de acrossomo, MAI aderida ao núcleo (EP) (31500x); c) distensão e ruptura da MAE (seta), manutenção na homogeneidade de conteúdo (23000x) (EP); d) distensão de membrana plasmática (MP) e MAI, semelhante a edema, heterogeneidade de conteúdo e membrana MAI aderida ao núcleo (EP) (42000x), Botucatu, 2004.	94

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A conservação das espécies está intrinsecamente ligada à manutenção da variabilidade genética. Quando uma população é isolada geograficamente e fica sujeita à uniformidade genética, vários fatores se aliam para desencadear o processo de extinção. Entre estes fatores estão a diminuição da fertilidade, maior susceptibilidade à doenças e elevação da mortalidade infanto-juvenil (Ralls *et al.*, 1979; O'Brien *et al.*, 1985, Wildt *et al.*, 1987)

A população humana e suas atividades continuam se expandindo de maneira desenfreada, tornando a fragmentação de habitat desordenada e contínua. Pela mão do homem, tivemos uma abrupta aceleração no processo de extinção de espécies e um rompimento com o processo evolutivo natural (Wildt, 1989; Lasley *et al.*, 1994; Bainbridge e Jabbour, 1998).

Na tentativa de minimizar este caminho destrutivo, idealizou-se o Banco Genômico que visa armazenar materiais biológicos de cunho genético (Wildt, 1992; Leibo e Songsasen, 2002) e que, no Brasil, está inserido dentro de um conceito mais amplo, o Banco de Amostras Biológicas. Gametas e embriões congelados que permanecem viáveis após a descongelação podem ser transportados no tempo e no espaço e ser utilizados, com auxílio das biotécnicas

reprodutivas, para incrementar o vigor genético de populações ameaçadas. A teoria é lógica. A prática ainda deixa a desejar.

Muitas espécies apresentam uma queda inaceitável na qualidade do sêmen após a descongelação, devido principalmente aos danos causados na membrana plasmática e acrossomais. Entre as espécies felinas isto é comum (Byers *et al.*, 1989, Pukazhenthii *et al.*, 1999, Leibo & Songsasen, 2002), ainda mais se considerarmos que muitas são teratospérmicas, isto é possuem alta porcentagem (> 60%) de espermatozóides defeituosos (Wood *et al.*, 1993; Pukazhenthii *et al.*, 1999; Pukazhenthii *et al.*, 2001; Penfold *et al.*, 2003). Além disto, as fêmeas da maioria das espécies felinas apresentam ovulação induzida. O sucesso da inseminação artificial com sêmen descongelado em felinos é, portanto, um múltiplo desafio, pois além da notável queda na fertilidade do sêmen (Pukazhenthii, 2000), a indução hormonal à ovulação não é bem sucedida nas espécies (Pope, 2000) e gera alterações do ambiente uterino, afetando o transporte embrionário (Graham *et al.*, 2000).

Vários estudos em fisiologia e biotecnologia reprodutiva têm sido desenvolvidos em felinos. Muito ainda está por se saber. Espera-se que, numa corrida contra o tempo, as próprias mãos do homem possam abrandar o processo destrutivo que desencadearam, visto que sua interferência no meio é real e irrevogável.

Em termos gerais, o objetivo deste estudo foi analisar as conseqüências do processo de congelação e descongelação do sêmen em três espécies de pequenos felinos: jaguatirica (*Leopardus pardalis*), gato-do-mato-pequeno (*L. tigrinus*) e gato doméstico (*Felis catus*), além de experimentar um protocolo diferenciado de congelação para as espécies, com a finalidade de obter sêmen viável para utilização em técnicas reprodutivas.

REVISÃO DE LITERATURA

1. ASPECTOS GERAIS DA CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN

“A tecnologia do armazenamento de sêmen foi revolucionada há aproximadamente 50 anos, com a descoberta do glicerol como crioprotetor. Isto permitiu que o sêmen pudesse ser congelado, estocado por períodos prolongados e, então, utilizado para inseminação artificial. Por sorte, os pioneiros escolheram trabalhar com sêmen de bovinos e galos. Se tivessem começado com roedores, marsupiais ou suínos, por exemplo, teriam encontrado uma série de problemas espécie-específicos até hoje difíceis de solucionar” (Holt, 2000b).

Durante o processo de criopreservação, a célula espermática é exposta a inúmeros fatores estressantes, que podem estar ligados ao choque térmico durante o resfriamento do sêmen, à formação de cristais intracelulares de gelo ou ao choque osmótico durante a congelação e descongelação, ou ainda ao estresse ligado à adição e ação do crioprotetor (Watson, 2000). A resposta celular a cada particularidade deste processo é diferente em cada espécie (Holt, 2000b).

Durante o resfriamento entre +30°C e zero, a célula espermática pode sofrer uma gama de alterações que afetam principalmente a membrana plasmática. A este conjunto de alterações dá-se o nome de estresse térmico ou choque térmico (Watson, 2000).

A membrana espermática possui uma proporção e uma combinação de lipídios distinta das demais membranas, o que lhe proporciona fluidez e instabilidade e garante maleabilidade na

função seletiva da membrana. Em temperaturas fisiológicas, regiões de lipídios em fase gel e em fase fluida coexistem. Quando submetidos a reduções artificiais de temperatura, porém, principalmente em temperaturas entre 36°C e 17°C, os lipídios alteram seu estado físico fazendo a transição do estado fluido para gel (Holt, 2000a). Esta mudança de estado é causada por uma desorganização dos componentes lipídicos e gera alterações na capacidade de permeabilidade seletiva da membrana (Watson, 2000).

É possível que a desordem da camada lipídica possa desestruturar os constituintes protéicos da membrana, conduzindo a um aumento de permeabilidade após o resfriamento. Se isto ocorre às proteínas que funcionam como canais iônicos, a função destas proteínas é afetada. A consequência é um aumento pronunciado no influxo celular de Ca^{++} durante o resfriamento, mimetizando o que ocorre fisiologicamente na capacitação espermática, todavia, de maneira caótica (Watson, 2000).

A capacitação do espermatozóide, quando ocorre fisiologicamente, advém da resposta a secreções do trato genital feminino (Bedford, 1970) e é definida como um conjunto de eventos reversíveis e tempo-dependentes que antecede a reação acrossômica (Muller, 2000). Entre estes eventos estão: a perda de proteínas extrínsecas, incluindo fatores de estabilização de acrossomo; perda de colesterol, resultando em maior fluidez da membrana; influxo de íons cálcio e bicarbonato (Muller, 2000). Acredita-se que a capacitação possa ainda envolver mudanças na superfície espermática, desmascarando supostos receptores de membrana (Bedford, 1970). Durante o processo, a motilidade espermática tem seu padrão alterado (Yanagimachi, 1993; Muller, 2000) e é então denominada hipermotilidade (Yanagimachi, 1993). A capacitação precede a reação acrossômica, que abrange a fusão das membranas acrossômica e plasmática, vesiculação e exocitose das enzimas acrossômicas quando o

espermatozóide entra em contato com a zona pelúcida, propiciando a fecundação do ovócito (Muller, 2000).

As alterações “tipo capacitação” ou “falsa capacitação”, derivadas do choque térmico, também causam alteração do padrão de motilidade e podem culminar numa reação acrossômica “espontânea” (Holt, 2000a; Muller, 2000), porém diferindo bioquimicamente e morfológicamente da reação acrossômica induzida pela zona pelúcida (Muller, 2000) e inviabilizando a célula espermática para fertilização (Holt, 2000a).

Outras estruturas celulares também mostram sensibilidade ao frio, auxiliando no desenvolvimento da lesão acrossômica. A F-actina, um dos elementos formadores do citoesqueleto, sofre despolimerização induzida pelo frio (Saunders e Parks, 1999; Macintosh, 2003), desestabilizando a estrutura de sustentação celular e permitindo a aproximação e a fusão das membranas plasmática e acrossomal externa, semelhante ao que ocorre durante a reação acrossômica que ocorre no trato feminino (Spungin *et al.*, 1995).

Os danos provocados pela queda de temperatura não são totalmente reversíveis quando o sêmen é reaquecido, o que se traduz diretamente em queda da motilidade espermática, quer seja quantitativa ou qualitativa (de Leeuw *et al.*, 1993; Gilmore *et al.*, 1998).

Algumas espécies necessitam de uma pausa de várias horas antes do congelamento para desenvolver resistência máxima ao choque térmico (Watson, 1979). Este período, denominado de período de equilíbrio, permite que haja tempo suficiente para que ocorram alterações na membrana ou para que ocorra fluxo de íons que resultem em ganho de resistência contra choque térmico (Watson, 1990). Em algumas espécies, como nos suínos, o

sêmen mantém melhor suas características se incubado em temperatura ambiente (Watson, 2000); porém, em outras espécies, há vantagens em resfriar o sêmen até 4 a 5°C, quando este é diluído em um meio adequado, permitindo que os espermatozóides diminuam seu metabolismo (Brinsko *et al.*, 2000), interajam com o meio e adquiram resistência ao frio (Jasko, 1994).

Quando as células são congeladas lentamente, são submetidas ao estresse resultante das interações água-soluto que surge após o congelamento do meio extracelular (de 0 a – 50°C). O meio extracelular não se congela de maneira homogênea. Na proporção em que a temperatura cai, a água cristaliza e, conseqüentemente, formam-se bolsas de soluções concentradas não congeladas. Algumas células ficam excluídas dos cristais de gelo e são, portanto, expostas ao meio hiperosmótico. Isto resulta em efluxo de água intracelular com conseqüente desidratação e possível influxo de íons (Mazur, 1984). Se a célula for exposta ao meio hipertônico por tempo prolongado, ocorrem danos à membrana por remoção de proteínas de sua constituição (Holt, 2000a), o que se traduz em lesão desta membrana. A descongelação envolve um efeito reverso. Se não for realizada lentamente, causará um rápido influxo de água, podendo resultar em ruptura da membrana plasmática.

Por outro lado, quando a congelação é realizada de maneira ultra-rápida, não há tempo suficiente para que ocorra efluxo de água e há possibilidade de formação de cristais de gelo intracelulares. Neste caso, se o processo de descongelação não for rápido também, os cristais se reorganizam e acabam por romper a membrana (Mazur e Koshimoto, 2002).

Acredita-se que a taxa ideal para congelação seja lenta o suficiente para prevenir este desfecho letal, mas veloz o bastante para minimizar os efeitos deletérios da exposição

prolongada ao meio hipertônico (Holt, 2000a). Embora esta afirmação seja subjetiva, estudos espécie-específicos sobre a condutividade hidráulica da membrana plasmática durante o processo de congelação vêm sendo desenvolvidos (Pukazhenthil *et al.*, 1997; Devireddy *et al.*, 1999; Devireddy *et al.*, 2002; Mazur e Koshimoto, 2002,). Estes dados tornarão possível a adequação das taxas ideais de congelação para cada espécie, otimizando as técnicas de criopreservação (Devireddy *et al.*, 1999).

Não está bem estabelecido se a maior parte das lesões de membrana plasmática ocorre, de fato, durante o processo de congelação do sêmen, ou durante o seu reaquecimento. Medrano *et al.* (2002), utilizando um criomicroscópio, verificaram que a membrana plasmática permanecia intacta durante a congelação até -50°C ; entretanto, quando reaquecido, o sêmen apresentava baixa proporção de células com membranas íntegras. Sugere-se, com isso, que o reaquecimento seja o momento crítico na criopreservação do sêmen.

Para minimizar os efeitos estressantes da congelação, algumas substâncias crioprotetoras são adicionadas ao diluente de sêmen, promovendo alterações das propriedades físicas da solução. Estes agentes crioprotetores podem penetrar ou não a membrana plasmática, dependendo do seu peso molecular (Amann e Pickett, 1987).

Os crioprotetores intracelulares são caracterizados pelo baixo peso molecular e por sua propriedade de ligação com moléculas de água (propriedade coligativa), reduzindo a formação de cristais de gelo durante a congelação. O crioprotetor intracelular de escolha para espermatozóides é o glicerol (Watson, 1990), porém outras substâncias podem ser utilizadas, de maneira isolada ou associada, como outros álcoois (etanol, etilenoglicol, metanol), o

dimetil sulfóxido (DMSO) e as aminas (formaamida, acetamida, lactamida) (Nash, 1966; Watson, 1990; Devireddy *et al.*, 1999).

A ação benéfica do glicerol está vinculada a suas propriedades coligativas, depressão do ponto de congelação e conseqüente redução da concentração de eletrólitos na fração não congelada, o que minimiza os efeitos deletérios da hiperosmolaridade durante o processo de congelação (Lovelock e Polge, 1954). Noiles *et al.* (1997) acreditam que o crioprotetor cause uma ruptura das interações entre as proteínas de membrana e o citoesqueleto, tornando a célula mais tolerante ao estresse osmótico e conseqüente fluxo de água pela membrana. Porém, apesar de aumentar a taxa de sobrevivência dos espermatozóides após a descongelação, o glicerol é apontado como responsável por perda na habilidade de fertilização do espermatozóide (Hammerstedt e Graham, 1992).

Os efeitos colaterais do glicerol são resumidos na tolerância espécie-específica da célula espermática ao crioprotetor. Algumas espécies não toleram o glicerol, como os camundongos, e outras, como alguns marsupiais, necessitam de porcentagens relativamente altas (aproximadamente 20%) de glicerol no diluente de sêmen para que se exerça função crioprotetora (Holt, 2000b). Não se conhece, ao certo, o que define esta tolerância. Hammerstedt e Graham (1992) sugeriram que o glicerol afete a fluidez da membrana, intercalando-se à camada lipídica bidimensional e que sua presença influencie a viscosidade do meio intracelular, alterando as taxas dos processos de difusão e as reações metabólicas. Portanto, de acordo com as variações de constituição da membrana e da viscosidade intracelular, cada espécie pode mostrar uma tolerância particular ao crioprotetor.

Além destes supostos efeitos, acredita-se que a adição ou remoção de crioprotetores intracelulares possa gerar estresse osmótico transitório para a membrana plasmática (Gao *et al.*, 1995) e que o glicerol possa agir agente indutor de alterações características da capacitação espermática (Slavik, 1987).

Os efeitos adversos do glicerol sobre o espermatozóide podem ser minimizados em temperaturas mais baixas (Watson, 1990). Por esta razão, alguns autores defendem a adição de glicerol durante uma segunda diluição do sêmen, realizada após o resfriamento a 5°C (Axnèr e Linde-Fosberg, 2002; Gil *et al.*, 2003). Este procedimento, porém, pode ser considerada pouco prático (Watson, 1990), principalmente quando se opta pela técnica de armazenamento do sêmen em palhetas, uma vez que seria necessário dispor de uma câmara fria para efetuar o envasamento.

A formamida é outro crioprotetor intracelular, assim como o glicerol. Possui a metade dos sítios de ligação com moléculas de água que o glicerol, portanto menor propriedade coligativa. Apresenta menor solubilidade em água e proporciona menor viscosidade, permitindo maior permeabilidade de membrana e diminuindo a possibilidade de danos celulares por estresse osmótico (Ball e Vo, 2001).

Agentes crioprotetores intracelulares são freqüentemente utilizados no diluente de sêmen, associados a crioprotetores não penetrantes ou extracelulares. Os crioprotetores extracelulares são representados por macromoléculas de alto peso molecular, tais como os açúcares, lipoproteínas da gema de ovo, proteínas do leite e alguns aminoácidos. Aumentam a osmolaridade extracelular e produzem efluxo de água, prevenindo a formação de cristais de gelo no interior da célula (Amann e Pickett, 1987).

A gema de ovo, por exemplo, é amplamente utilizada como agente estabilizador da membrana plasmática, protegendo-a contra o choque térmico (Watson, 1990; Holt, 2000a; Luvoni *et al.*, 2003a). Acredita-se que esta ação protetora seja fornecida pela sua ação coloidal no meio e por um componente da gema, uma lipoproteína de baixa densidade (LDP), cujo mecanismo de ação ainda não foi elucidado (Watson, 1979). Apesar disso, há autores que acreditam que a gema de ovo também tenha ações deletérias, agindo como indutora de capacitação espermática e alterando a estrutura da cromatina do sêmen criopreservado (Gil *et al.*, 2003).

Outro produto de origem animal de uso freqüente na composição de meios diluidores é o leite. Salomon e Maxwell (2000) verificaram que o leite, assim como a gema de ovo, confere uma ação protetora sobre o espermatozóide contra o choque térmico, atuando também como tampão e agente quelante frente a metais pesados. Porém, tanto a gema de ovo quanto o leite representam riscos para a sanidade animal, já que podem carrear patógenos (Gil *et al.*, 2003; Luvoni *et al.*, 2003a). Além disso, as proteínas existentes no leite e na gema podem funcionar como agentes alergênicos dentro do trato genital feminino, interferindo no processo de fertilização (Watson, 1990).

Os açúcares, além de atuarem como fonte de energia (monossacarídeos: frutose, glicose), também exercem ação crioprotetora (dissacarídeos e trissacarídeos: sucrose, rafinose, trealose), prevenindo a desidratação intensa da célula espermática durante o processo de congelamento (Holt, 2000b).

Além de crioprotetores, vários tipos de aditivos podem ser incorporados ao diluente de sêmen a fim de incrementar sua ação, tais como tampões, estimulantes, antioxidantes e detergentes. Os tampões têm a função de neutralizar o pH do diluente e do sêmen, já que este é constituído

por células com metabolismo ativo, cujos metabólitos promovem a acidificação constante do meio extracelular. São freqüentemente utilizados o citrato de sódio, o tris-hidroximetil-aminometano (TRIS), o ácido N-trishidroximetil metil-2-aminometano-sulfônico (TES) (Holt, 2000a).

Acredita-se que os detergentes a base de SDS (dodecil sulfato de sódio) – Equex STM Paste® (Nova Chemical Sales, Scituate Inc., M.A., EUA) e Orvus ES Paste® (Proctor & Gamble, Cincinnati, OH, EUA) - dissolvam as lipoproteínas da gema de ovo, aumentando seu potencial de penetração na membrana plasmática e, por consequência, sua ação crioprotetora (Holt, 2000b; Peña *et al.*, 2003). Em cães, entretanto, a exposição prolongada ao SDS antes do congelamento não foi benéfica, ocasionando uma provável fluidez excessiva da membrana (Peña *et al.*, 2003).

2. A FAMÍLIA E AS ESPÉCIES

A família *Felidae* está classificada dentro da ordem *Carnivora*, que por sua vez pertence à classe *Mammalia* (Nowak e Paradiso, 1991). É constituída atualmente de 37 espécies, que divergiram de um recente ancestral comum, há cerca de 10 a 15 milhões de anos (Johnson e O'Brien, 1997) e se espalharam por todos os continentes, exceto a Antártica e Austrália (Wilson e Reeder, 1992). São atualmente reconhecidos oito grupos que refletem as radiações evolucionárias monofiléticas na história da família (Johnson e O'Brien, 1997).

Na América Latina, encontram-se dez espécies (Oliveira, 1994) que representam três desses grupos: da linhagem da jaguatirica, tendo como representantes a jaguatirica, o gato-maracajá, o gato-do-mato-pequeno, o gato-do-mato-grande, o gato-palheiro, o gato-andino e o gato-chileno; do grupo panthera, a onça pintada; do grupo do puma, a suçuarana e o gato-mourisco (Johnson e O'Brien, 1997). Pelo fato de habitarem a Região Neotropical, são conhecidos como felídeos neotropicais (Eisenberg e Redford, 1992).

A linhagem da jaguatirica é formada por um grupo de sete espécies felinas de pequeno a médio porte, que se irradiaram provavelmente de um ancestral comum, durante a formação do istmo do Panamá, cerca de cinco a seis milhões de anos atrás (Slattery *et al.*, 1994). Seus integrantes se distribuem em dois gêneros: *Oncifelis* e *Leopardus* (O'Brien, 1996). Possuem uma característica especial em comum: um par de cromossomos a menos em seu material genético que os demais felinos, consequência de uma fusão cromossômica (Robinson, 1974).

O gênero *Leopardus* constitui-se de três espécies de gatos pintados: *Leopardus pardalis*, *L. wiedii* e *L. tigrinus*, respectivamente conhecidas como jaguatirica, gato-maracajá e gato-do-mato-pequeno. Na natureza estas três espécies possuem uma distribuição ampla dentro da América Latina, ocupando uma grande variedade de habitats, no caso da jaguatirica, e mostrando uma preferência por florestas, no caso do gato-do-mato-pequeno e do gato-maracajá (Oliveira, 1994).

A maior causa do declínio da população destes felinos na América Latina está vinculada à fragmentação ou perda de habitat em decorrência das atividades humanas, como a expansão agro-pecuária, a construção de hidrelétricas, o crescimento demográfico e também a caça em resposta à ação predatória de felinos sobre animais domésticos (Oliveira, 1994).

Embora seja comum avistá-los nos zoológicos brasileiros, sabe-se que os pequenos felinos não se reproduzem facilmente em cativeiro (Censo de Animais da Sociedade de Zoológicos do Brasil, 2002), por motivos principalmente ligados à nutrição (Swanson *et al.*, 1995), ao estresse causado pelas más condições de manutenção (Mellen, 1991; Swanson *et al.*, 1995; Moreira, 2001), a problemas genéticos e a falhas no manejo reprodutivo derivadas da falta de conhecimento da fisiologia reprodutiva básica (Mellen, 1991).

Baseando-se em todo este quadro, um número crescente de estudos vem sendo desenvolvido no intuito de esclarecer as peculiaridades da fisiologia reprodutiva de cada espécie. Estes dados tornam possível a adequação do manejo reprodutivo para espécimes cativos, além de fornecer informações para o incremento das biotécnicas reprodutivas específicas.

Fisiologia Reprodutiva

Em termos morfológicos, o pênis dos felinos do gênero *Leopardus* é semelhante ao do gato doméstico, com exceção ao gato-maracajá (*Leopardus wiedii*), que não apresenta espículas penianas (Swanson *et al.*, 1995, Morais, 1999). As espículas são estruturas córneas andrógeno-dependentes, responsáveis pelo estímulo neuro-endócrino necessário para que ocorra ovulação durante a cópula (Johnston *et al.*, 2001). É interessante destacar que, assim como o macho, a fêmea de gato-maracajá também apresenta particularidades reprodutivas, sendo a única em seu gênero a apresentar episódios freqüentes de ovulação espontânea (Moreira *et al.*, 2001), sugerindo necessitar de estímulos menos intensos para ovular.

Em 1995, Swanson *et al.* publicaram um levantamento sobre parâmetros reprodutivos em machos de oito espécies endêmicas de felinos, mantidas em instituições latino-americanas. Constataram que, em geral, os animais se reproduziam pouco e que a maior parte dos ejaculados obtidos era azoospermico ou possuía menos que um milhão de espermatozoides. Embora os autores deste estudo reconhecessem que múltiplas variáveis pudessem estar envolvidas, sugeriram que a dieta inadequada e o estresse decorrente de condições precárias de manutenção pudessem ser os fatores mais limitantes.

Morais *et al.* (1996) e Moraes *et al.* (1997) apresentaram dados preliminares sobre a função reprodutiva das espécies do gênero *Leopardus*, mantidos sob dieta adequada. Observaram que os machos de jaguatirica apresentaram a maior concentração média de andrógenos fecais, e a menor concentração média de corticóides fecais, sugerindo que, em relação às duas outras espécies, a jaguatirica pudesse ser menos sensível ao estresse gerado pelo cativeiro.

O sêmen de jaguatirica foi considerado de excelente qualidade quando comparado a outros integrantes da família *Felidae* (Swanson *et al.*, 1996a), com boa motilidade espermática e uma taxa de espermatozoides morfologicamente normais acima da média (Morais *et al.*, 2002). O gato-do-mato-pequeno apresentou maior incidência de defeitos espermáticos, porém dentro da faixa esperada para felinos selvagens, com destaque para a peça intermediária dobrada com gota, o que os autores relacionaram aos defeitos de maturação espermática. Constatou-se que as espécies do gênero *Leopardus* mantêm atividade espermatogênica durante o ano inteiro, embora haja picos de atividade no verão (Morais *et al.*, 2002).

Alguns poucos estudos relataram valores médios para as características seminais das espécies jaguatirica e gato-do-mato-pequeno, que estão relatados nas tabelas 1 e 2. A escassez de dados está relacionada às dificuldades em trabalhar com estas espécies. A quantidade e a

disposição geográfica dos animais cativos mostram-se pouco práticas à pesquisa. Por este motivo, o gato doméstico assume um importante papel como modelo experimental para a compreensão da fisiologia reprodutiva e utilização de biotécnicas reprodutivas em felídeos (Goodrowe *et al.*, 1989; Swanson e Wildt, 1997; Farstad, 2000; Pukazhenthii *et al.*, 2001).

Tabela 1. Valores médios ($\pm$ erro padrão) para peso corporal, volume testicular e características seminais de *Leopardus tigrinus*, obtidos em duas referências de literatura*. Entre parênteses: número de ejaculados e número de animais utilizados, respectivamente.

	<i>Leopardus tigrinus</i>	
	1* (10, 18)	2* (52, 4)
Peso corporal (Kg)	-	3,00 $\pm$ 0,10
Volume testicular total (cm ³)	-	4,20 $\pm$ 0,20
Volume do ejaculado (mL)	0,11 $\pm$ 0,02	0,30 $\pm$ 0,10
pH	-	7,60 $\pm$ 0,10
Concentração espermática (x10 ⁶ sptz/mL)	78,50 $\pm$ 33,80	411,90 $\pm$ 46,30
Nº sptz móveis por ejaculado (x10 ⁶)	9,40 $\pm$ 3,70	74,20 $\pm$ 9,90
Índice de motilidade progressiva	62,80 $\pm$ 5,30	74,10 $\pm$ 1,80
Espematozóides normais (%)	35,60 $\pm$ 6,00	59,20 $\pm$ 3,50

* 1 Swanson *et al.* (1995)

2 Morais *et al.* (2002)

Tabela 2. Valores médios ($\pm$ erro padrão) para peso corporal, volume testicular e características seminais de *Leopardus pardalis*, obtidos em três referências de literatura*.Entre parênteses: número de ejaculados e número de animais utilizados, respectivamente.

	<i>Leopardus pardalis</i>		
	1* (5, ?)	2* (12, 38)	2* (42, 3)
Peso corporal (Kg)	-	-	14,30 $\pm$ 0,40
Volume testicular total (cm ³)	-	-	32,00 $\pm$ 1,30
Volume do ejaculado (mL)	0,30 $\pm$ 0,10	0,62 $\pm$ 0,08	1,40 $\pm$ 0,10
pH	-	-	7,50 $\pm$ 0,10
Concentração espermática (x10 ⁶ spz/mL)	28,00 $\pm$ 17,00	53,80 $\pm$ 17,80	101,20 $\pm$ 10,6
Nº spz móveis por ejaculado (x10 ⁶)	-	34,30 $\pm$ 11,90	114,70 $\pm$ 15,8
Motilidade espermática (%)	72,00 $\pm$ 12,50	70,40 $\pm$ 2,30	81,40 $\pm$ 1,20
Motilidade progressiva (0-5)	4,00 $\pm$ 0,50		3,70 $\pm$ 0,10
Espermatozóides normais (%)	80,80 $\pm$ 0,90	58,40 $\pm$ 5,80	82,40 $\pm$ 1,20

* 1 Howard (1993)

2 Swanson *et al.* (1995)

3 Morais *et al.* (2002)

Assim como o macho do gênero *Leopardus*, o gato doméstico é capaz de produzir consistentemente espermatozóides viáveis, com motilidade espermática progressiva por todo o ano (Spindler e Wildt, 1999). França e Godinho (2000) relataram que, embora as células de Sertoli tenham uma baixa capacidade de suporte na espécie, o parênquima testicular possui um alto percentual de túbulos seminíferos (90%) e uma duração relativamente curta de cada ciclo espermatogênico (10,4 dias), fazendo com que a eficiência espermatogênica dos gatos domésticos esteja situada em um patamar intermediário entre as espécies de mamíferos.

O pênis do gato apresenta glândula em formato cônico, com 6 a 8 fileiras totalizando 120 a 150 espículas andrógeno-dependentes que, histologicamente, são constituídas de tecido conjuntivo coberto por epitélio cornificado, semelhantes às papilas da língua do gato (Johnston *et al.*, 2001).

Em uma revisão sobre ereção e ejaculação no gato doméstico, Johnston *et al.* (2001) descreveram que a ereção peniana, assim como a ejaculação, é mediada por fibras nervosas somáticas, parassimpáticas e simpáticas. A estimulação de fibras parassimpáticas de nervos sacrais é responsável pela ereção; por sua vez o estímulo do tronco simpático de L1 a L2, ou do nervo hipogástrico causa emissão de fluido seminal pela uretra. Quando se estimula o nervo pudendo interno (somático), tem-se o estímulo para a ejaculação. O estímulo em fibras nervosas simpáticas periféricas ou centrais causa a abertura do colo da vesícula urinária, sendo comum o achado de espermatozóides neste órgão, fenômeno este conhecido como ejaculação retrógrada.

A ejaculação retrógrada pode ocorrer numa frequência de 15 a 92% das ejaculações fisiológicas. Os espermatozóides encontrados na urina colhida logo após a ejaculação podem manter uma certa motilidade, a despeito do ambiente desfavorável (Dooley *et al.*, 1991).

Colheita de sêmen

A técnica de eleição para colheita de sêmen em felinos é a eletroejaculação, visto que a técnica pode ser aplicada em animais anestesiados. Um dos primeiros protocolos adaptado para gatos domésticos foi descrito por Platz *et al.*, em 1978, que sugeria estímulos seriados de 2 a 8 volts e 5 a 220 miliamperes. Estudos posteriores verificaram que a contaminação do sêmen com urina estava associada à aplicação de estímulos com voltagens altas (8V) (Pineda e Dooley, 1984).

O protocolo mais utilizado hoje é o proposto por Howard *et al.* (1990) para gatos domésticos e extrapolado para carnívoros (Howard, 1993). Consiste na utilização de um transdutor composto por três eletrodos longitudinais dispostos ventralmente, cuja função é estimular o plexo pélvico, mimetizando uma ejaculação fisiológica. O tamanho do transdutor varia de acordo com o porte do animal. São descritas três séries de 30, 30 e 20 estímulos respectivamente, separadas por 2 a 3 minutos de descanso, sendo cada série dividida em 10 subséries, com estímulos crescentes que variam entre 2 a 5V (Tabela 3)

Tabela 3 Protocolo de estímulos para eletroejaculação proposto para carnívoros (Howard, 1993).

	<i>1ª série</i>			<i>2ª série</i>			<i>3ª série</i>	
Número de estímulos	10	10	10	10	10	10	10	10
Intensidade (V)	2	3	4	3	4	5	4	5

O sêmen proveniente de eletroejaculação tende a ter volume e pH mais elevados e concentração menor que o sêmen obtido durante uma ejaculação fisiológica (Platz e Seager, 1978; Johnston *et al.*, 1988; Johnston *et al.*, 2001; Axnèr e Linde-Fosberg, 2002). Isto ocorre devido ao estímulo direto sobre as glândulas acessórias, principalmente a próstata, cujo fluido é alcalino ($7,8 \pm 0,6$). (Johnston *et al.*, 1988; Axnèr e Linde-Fosberg, 2002).

A obtenção de sêmen diretamente da cauda do epidídimo e ducto deferente é uma técnica que tem sido utilizada com frequência para os propósitos da reprodução assistida. É um recurso precioso em casos de animais que precisam ser esterilizados ou que vêm a óbito, já que o espermatozóide obtido por esta técnica é capaz de se capacitar, ligar-se à zona pelúcida, descondensar o núcleo e fertilizar (Goodrowe e Hay, 1993; Hay e Goodrowe, 1993; Luvoni *et al.*, 2003a; Tsutsui *et al.*, 2003).

Os testículos podem ser mantidos em temperatura ambiente por até 5 horas, sem grande perda da motilidade espermática (Schäfer e Holzmann, 2000); ou *overnight*, sob refrigeração a 5°C (Goodrowe e Hay, 1993). Axnèr *et al.* (1998) estudaram diferenças entre a morfologia de espermatozóides provenientes da cauda do epidídimo e do sêmen obtido por eletroejaculação. Relataram que o ejaculado apresentava maior porcentagem de células com anormalidades de cauda e sugeriram que era efeito das alterações de fluido seminal provocadas pela técnica de colheita. A gota citoplasmática distal foi o defeito mais incidente em espermatozóides provenientes da cauda do epidídimo e está relacionada com o processo de maturação espermática durante sua passagem pelo epidídimo (Axnèr *et al.*, 1999). Supõe-se que o espermatozóide perca este resquício citoplasmático durante a ejaculação (Axnèr *et al.*, 1998).

Criopreservação do sêmen felino

São dois os métodos de criopreservação de sêmen em felinos: a refrigeração e a congelação. A refrigeração consiste na manutenção do sêmen a 4 ou 5°C, geralmente adicionado a um diluente (Harris *et al.*, 2001; Harris *et al.*, 2002). É o método indicado para utilização em biotécnicas reprodutivas, quando o transporte do sêmen pode ser realizado em questão de horas ou até poucos dias. A congelação do sêmen em nitrogênio líquido é o segundo método. É a forma de armazenamento de eleição para integrar o Banco de Recursos Genéticos. O sêmen congelado tem um grande potencial para conservação, já que pode ser armazenado por tempo indeterminado e transportado a qualquer distância para utilização em biotécnicas reprodutivas.

Já foram descritos protocolos variados para congelar o sêmen felino (Swanson *et al.*, 1996a; Axnèr e Linde-Fosberg; 2002; Zambelli *et al.*, 2002). O mais utilizado para espécies

selvagens é o proposto pelo manual de treinamento do CENTER FOR NEW OPPORTUNITIES IN ANIMAL HEALTH SCIENCES, National Zoological Park, EUA, proposto na década de 90. As etapas desta técnica serão descritas a seguir.

A colheita de sêmen segue o protocolo proposto por Howard (1993). Cada uma das três frações de sêmen obtidas das séries de estímulos é mantida a 37°C. O volume total do ejaculado é mensurado e diluído (1:1) em meio de cultura Ham's F10 (piruvato, glutamina, antibióticos e 5% de soro fetal bovino) a 37°C. A diluição é, então, mantida em temperatura ambiente. São retiradas as alíquotas necessárias à avaliação do sêmen (motilidade espermática, motilidade progressiva ou vigor espermático, concentração, morfologia espermática). O sêmen é centrifugado a 300g por 10 minutos para a retirada do plasma seminal. Ao *pellet* formado é adicionado lentamente (durante 5 minutos) o criodiluyente PDV-62 (Platz Diluent Variant - 11% lactose, 20% gema, estreptomicina e penicilina 1 mg/mL, 4% glicerol, em água destilada ultrapurificada) até atingir uma concentração final de 50 a 100 milhões de espermatozóides móveis/mL. A amostra diluída é mantida em geladeira a 5°C por 30 minutos. Deve-se manter todo o material que entrará em contato com o sêmen, como pipetas e ponteiros, a 5°C. O armazenamento do sêmen pode ser feito com auxílio de palhetas ou em forma de *pellets*.

Para proceder à técnica de congelamento em *pellets*, devem ser feitas depressões de 3 mm de diâmetro por 3 mm de altura em um bloco de gelo seco. O sêmen mantido em geladeira é homogeneizado e, com auxílio de pipeta, depositado nas depressões do bloco, por três minutos. O *pellet* formado é mergulhado em nitrogênio líquido e transferido para um criotubo identificado, que será conservado em botijão criogênico, até o momento da utilização.

Para congelação em palhetas, sugere-se a utilização de palhetas de 0,25 mL para grandes felinos, e palhetas seccionadas para um volume de 40 µL para pequenos felinos. Palhetas identificadas são preenchidas com 30 µL de sêmen diluído em PDV-62, antes do resfriamento. As palhetas são transportadas a um refrigerador e permanecem a 5°C por 30 minutos. Todo o processo de resfriamento e congelação do sêmen deve ser monitorado utilizando-se um termômetro. A taxa de congelação proposta para palhetas é de - 40°C/min até que seja atingida a temperatura de - 100°C, quando as palhetas são mantidas por 1 minuto e finalmente mergulhadas em nitrogênio líquido. As palhetas são armazenadas em botijão criogênico.

Dando continuidade à orientação do manual, a descongelação do sêmen estocado em forma de *pellet* ou palheta é realizada em banho-maria a 37°C por 30 segundos. Centrifuga-se a amostra a 300g/10 min, retira-se o sobrenadante e adiciona-se 100 a 200 µL de Ham's F10 a 37°C. Mantém-se a amostra em temperatura ambiente, protegida da luz, para avaliações ou para utilização em técnicas reprodutivas.

Esta metodologia tem sido utilizada, com poucas modificações, para congelar sêmen de felinos selvagens (Donoghue *et al.*, 1992; Swanson *et al.*, 1996a; Swanson *et al.*, 1996b). Porém, foi desenvolvida de maneira empírica, antes mesmo de se conhecer algumas propriedades específicas dos gametas, e possui muitas inadequações (Pukazhenthil *et al.*, 2000). Atualmente, estudos vêm sendo desenvolvidos em gatos domésticos com a finalidade de se conhecer melhor o comportamento da célula espermática felina frente às várias condições estressantes da criopreservação, objetivando a formulação de um protocolo mais apropriado.

Pukazhenth^{*}, em estudos não publicados, testou várias forças de centrifugação para o sêmen do gato doméstico e, verificou que 300g era a que causava menos danos ao espermatozóide felino.

Taxas mais lentas de resfriamento - 0,5°C/min (Pukazhenthⁱ *et al.*, 1999) - e de congelamento - 3,85°C/min (Zambelli *et al.*, 2002)-têm sido propostas para minimizar lesões de membrana plasmática e acrossomais.

Nelson *et al.* (1999) verificaram que porcentagens de glicerol ou DMSO acima de 4% comprometem o espermatozóide felino. A despeito disto, estudos recentes ainda preconizam a utilização de concentrações mais altas de glicerol para congelar o sêmen felino (Axnèr e Linde-Fosberg, 2002; Tsutsui *et al.*, 2003).

Outros diluentes podem ser utilizados para substituir o Ham's F10, como o Kenney (E-Z mixín Dupree, ARS, Califórnia, EUA), com incrementação de motilidade e vigor espermáticos (Comercio *et al.*, 2002); ou substituir o PDV-62, todos utilizando 20% de gema de ovo como substrato, tampões como o TRIS (trishidroximetil-aminometano), o TES (ácido N-trishidroximetil-metil-2-aminometano-sulfônico) e/ou ácido cítrico; açúcares como a frutose ou glicose, detergentes como o SDS (dodecil sulfato de sódio) e glicerol, como crioprotetor intracelular (Hay e Goodrowe, 1993; Axnèr e Linde-Fosberg, 2002; Zambelli *et al.*, 2002), com melhores resultados para a motilidade espermática após a descongelação (Hay e Goodrowe, 1993).

^{*} Pukazhenthⁱ, B. comunicação pessoal, 2002.

Quanto ao tipo de armazenamento do sêmen congelado, comparou-se a utilização de palhetas de 0,25 mL e *pellets*, sem diferenças significativas após o descongelamento para gatos domésticos e selvagens (Wood *et al.*, 1993; Swanson *et al.*, 1996b). Deve-se enfatizar que, se o objetivo for adaptar a técnica para realização a campo, deve-se optar pelas palhetas, já que a utilização do gelo seco nestas condições pode ser inviável (Swanson *et al.*, 1996b).

São escassos os trabalhos que apresentam dados sobre sêmen criopreservado em felinos selvagens. Byers *et al.* (1989), verificaram que o processo de congelação/descongelação causava uma “capacitação” prematura de espermatozóides, o que Pukazhenthii *et al.* (1999) atribuíram aos danos em membranas acrossomais decorrentes da criopreservação. Este mesmo estudo afirmou que estas lesões acrossômicas induzidas pelo frio têm início durante o resfriamento rápido (4 a 14°C/min) de 30°C até 4°C, porém não resultam em perda significativa da motilidade espermática.

As membranas acrossomais dos felinos parecem ser especialmente sensíveis ao frio (Leibo e Songsasen, 2002). Pope *et al.*, 1991, publicaram uma técnica simples e bastante utilizada para acessar a integridade do acrossomo por microscopia óptica, utilizando os corantes rosa bengala e *fast green* para coloração de acrossomos, sendo conhecida como coloração simples de “Pope”. Outros métodos, utilizando microscopia de epifluorescência, como o FITC-PNA (aglutinina de amendoim conjugada à fluoresceína) ou mesmo a microscopia eletrônica de transmissão também são eficientes, embora sofisticados (Long *et al.*, 1996; Pukazhenthii *et al.*, 1999).

Swanson *et al.* (1996a) avaliaram a integridade de acrossomo em espermatozóides de jaguatirica após a descongelação, utilizando a técnica de “Pope”. Encontraram uma

porcentagem de espermatozóides com lesões de acrossomo abaixo da esperada (50-60%), concluindo que o espermatozóide da espécie pode ser mais resistente às alterações de temperatura que os do gato doméstico (60-80%) (Hay e Goodrowe, 1993) ou da onça-pintada (*Panthera onca*) e do guepardo (*Acinonyx jubatus*) (70%) (Swanson *et al.*, 1996b).

Dados de literatura mostram que o sêmen de felinos domésticos e selvagens apresenta uma queda de 10 a 40 pontos percentuais na motilidade espermática após a congelação (Byers *et al.*, 1989, Donoghue *et al.*, 1992; Hay e Goodrowe, 1993; Swanson *et al.*, 1996b; Zambelli *et al.*, 2002; Tsutsui *et al.*, 2003).

Experimento I

Efeitos da criopreservação sobre a célula espermática em duas espécies de felinos neotropicais: gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*) e jaguatirica (*Leopardus pardalis*), utilizando dois diluentes de congelação.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ comparar a eficiência de dois diluentes (TEG e MP-50) sob o mesmo método de criopreservação, nas espécies *Leopardus tigrinus* e *Leopardus pardalis*, utilizando-se da quantificação dos danos causados ao sêmen;
- ❖ descrever as alterações ultra-estruturais da célula espermática resultantes do processo de congelação nas espécies *Leopardus tigrinus* e *Leopardus pardalis*.

MATERIAL E MÉTODO

1. LOCAL DO EXPERIMENTO

As colheitas de sêmen, análises iniciais e a congelação propriamente dita foram executadas nas dependências da Organização não Governamental Associação Mata Ciliar, em Jundiaí, São Paulo.

As análises pós-descongelação foram realizadas nos laboratórios do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da UNESP de Botucatu. O processamento do material para análise ultra-estrutural e a obtenção das respectivas imagens foram efetuadas no Setor de Microscopia Eletrônica, junto ao Instituto de Biociências (IB) da UNESP de Botucatu.

2. ANIMAIS

Foram colhidas amostras de cinco machos de cada espécie de felino neotropical: *Leopardus tigrinus* (gato-do-mato-pequeno) e *Leopardus pardalis* (jaguaririca), totalizando 15 e 17 ejaculados, respectivamente, sendo que dois animais foram considerados jovens (*L.tigrinus*, com aproximadamente dois anos de idade) e os demais, adultos. Os felinos estavam alojados em recintos providos de poleiros, caixas para esconderijo e plantas, em piso de terra e expostos à luz natural. Durante o experimento, foram mantidos nas mesmas condições em que já se encontravam, isto é, pareados ou não e sob o mesmo regime alimentar, constituído de pescoço de frango sem pele (3 a 5 vezes por semana), músculo bovino (1 a 2 vezes por semana) e presas inteiras (1 a 2 vezes por semana).

Tabela 3. Origem, idade estimada (anos), histórico de reprodução em cativeiro (nº de parições geradas) dos animais que integraram este estudo, *Leopardus tigrinus* (n=5) e *Leopardus pardalis* (n=5), Botucatu, 2004.

Gato-do-mato-pequeno (<i>Leopardus tigrinus</i>)			
<i>animal</i>	<i>origem</i>	<i>Idade</i>	<i>Histórico reprodutivo</i>
1	cativeiro	> 4	3
2	natureza	± 2	0
3	natureza	± 2	0
4	cativeiro	> 4	0
5	natureza	> 3	0
Jaguaririca (<i>Leopardus pardalis</i>)			
1	natureza	> 4	2
2	cativeiro	> 8	0
3	cativeiro	> 8	0
4	cativeiro	> 10	0
5	natureza	> 3	1

3. CONTENÇÃO FARMACOLÓGICA

A contenção física dos animais para aplicação dos fármacos foi realizada com auxílio de gaiolas de prensa e puçás. Foram utilizados três protocolos anestésicos:

- 1) cloridrato de cetamina, midazolam;
- 2) cloridrato de quetamina, midazolam, tartarato de butorfanol;
- 3) cloridrato de tiletamina e zolazepam.

Os animais foram inicialmente contidos com a utilização de um dos três protocolos descritos, cujas doses e outras especificações estão expostas na Tabela 4. Aplicações complementares de 5 mg/kg de cetamina ou 2 mg/kg de tiletamina/zolazepam foram efetuadas quando a contenção não proporcionava segurança para a manipulação do animal. A manutenção da anestesia para a colheita de sêmen foi realizada utilizando-se isoflurano.

Tabela 4. Fármacos utilizados para contenção de *Leopardus tigrinus* e *Leopardus pardalis*, nome comercial, concentração, dose e via de administração, Botucatu, 2004.

INDUÇÃO ANESTÉSICA			
Fármaco	Nome comercial	dose	via
Cloridrato de cetamina	Vetaset® 10% (Fort Dodge)	15 mg/kg	Intramuscular
Midazolam	Dormire® 5mg/mL (Cristália)	0,5 mg/kg	
Tartarato de butorfanol	Torbugesic® 1% (Fort Dodge)	0,2 mg/kg	
Cloridrato de tiletamina	Zoletil® 50 (Virbac)	10 mg/kg	
Zolazepam			

O plano anestésico, assim como as frequências respiratória e cardíaca e a temperatura corporal foram monitorados durante a intervenção. A qualquer sinal de irregularidade que

causasse desconforto ao animal ou perigo para a equipe técnica, o procedimento de colheita era momentaneamente interrompido.

4. EXAME ANDROLÓGICO

4.1 Avaliação da genitália externa

Os testículos foram palpados para definição da consistência. Com auxílio de um paquímetro de aço inox de 15,24 cm, foram mensurados o comprimento, a largura, e a altura, os quais foram aplicados à fórmula para obtenção do volume testicular (VT), em cm³:

$$VT = 4/3 \times p \times C/2 \times L/2 \times H/2$$

Onde C = comprimento (cm); L = largura (cm) e H = altura (cm).

Para obtenção do Volume Testicular Total (VTT), efetuou-se a somatória do volume dos dois testículos.

O pênis foi exposto para verificação da anatomia, aspecto, presença de espículas e de secreções no prepúcio.

4.2 Colheita de sêmen

O sêmen foi colhido pela técnica da eletroejaculação. O aparelho utilizado para a geração dos estímulos consistiu em um aplicador de corrente alternada com controle de voltagem (1 a 12

V) (Eletrovet[®], São Paulo, Brasil) (Figura 1). Os transdutores utilizados seguiram as dimensões propostas por Moraes (1999) para as espécies em questão. O protocolo de eletroejaculação utilizado foi baseado no proposto por Howard (1993), para carnívoros selvagens, porém houve variações, com exclusão ou inclusão de estímulos conforme a resposta do animal aos estímulos.



Figura 1. Detalhe do eletroejaculador (Eletrovet[®], São Paulo) e do frasco coletor, em colheita de sêmen em jaguatirica (*Leopardus pardalis*), Botucatu, 2004.

Para cada série de colheitas foi utilizado um frasco plástico tipo *Eppendorf* com capacidade para 1,5 mL (Figura 1). O frasco era substituído ao final de cada série ou quando havia indícios de contaminação com urina. Cada amostra de sêmen era avaliada em microscópio óptico para presença de espermatozóides móveis. O frasco era mantido em estantes adaptadas de isopor, em temperatura ambiente. Ao final do procedimento, mensurava-se o volume total resultante da união das amostras e se efetuavam as avaliações e o processamento do sêmen.

Quando se suspeitava de contaminação por urina, procedia-se a lavagem da amostra, por diluição em TRIS EQUEx (TE) (Tabela 6), centrifugação a 300g (minicentrífuga Hettich®, Alemanha) por 10 minutos, descarte do sobrenadante e suspensão no mesmo meio, em volume conhecido.

4.3 Avaliações do sêmen *in natura*

O sêmen foi analisado para: volume, aspecto, concentração e pH do ejaculado, motilidade espermática, vigor espermático, morfologia espermática e integridade funcional da membrana por meio do teste hiposmótico.

Técnicas de avaliação para sêmen *in natura*:

- ❖ Volume do ejaculado (µL): as alíquotas de sêmen em cada frasco coletor foram agregadas e o volume total foi mensurado com auxílio de micropipetas de volume variável;
- ❖ pH do ejaculado: foram utilizadas fitas graduadas entre 6,5 a 10 (Merk®) para mensurar o pH do ejaculado total;
- ❖ Motilidade e vigor espermáticos: uma alíquota de sêmen (2 µL) foi depositada diretamente sobre lâmina de vidro e coberta por lamínula, mantidas a 37°C, e observada em microscópio óptico com contraste de fase (200x) (Carl Zeiss®, Alemanha). A avaliação foi subjetiva e expressa em porcentagem para a

motilidade, e escores de zero a cinco para o vigor, sendo zero equivalente à ausência de movimento e cinco representando movimento retilíneo progressivo intenso.

- ❖ Concentração espermática (sptz/mL): utilizou-se a diluição sêmen/água destilada na proporção 1:50 ou 1:100, na dependência de uma avaliação subjetiva inicial da concentração do sêmen. Uma alíquota desta diluição (20 µL) era depositada nos dois lados de uma câmara de Neubauer espelhada e observada em microscópio óptico com contraste de fase (200x). Procedeu-se a contagem do número de espermatozóides em cinco quadrantes de cada lado. A concentração foi determinada pela fórmula padrão e representou o número de espermatozóides por mL do ejaculado.

$$C = 5 \times 10 \times N \times D \times 10^3 \text{ sptz/ mL}$$

Onde C é a concentração, 5 é o número de quadrantes contados em cada lado da câmara, 10 é a altura entre câmara e lamínula, N é a média do número de espermatozóides contados em cada lado da câmara, D é o fator de diluição da amostra (50 ou 100) e 10^3 corresponde à transformação de mm^3 para mL.

- ❖ Teste Hiposmótico (%): esta análise foi baseada nas técnicas utilizadas para outras espécies (Jeyendran *et al.*, 1984; Neild *et al.*, 1999). Efetuou-se a diluição (1:9) de uma alíquota de sêmen em solução hiposmótica (Tabela 5). A diluição permaneceu em banho-maria a 37°C por 30 minutos. A leitura foi realizada em microscópio óptico (200 a 400x) anotando-se a porcentagem de espermatozóides com cauda enrolada.

Tabela 5. Composição da solução hiposmótica (150 mOsm/kg), Botucatu, 2004

COMPOSIÇÃO	QUANTIDADE
Citrato de sódio 2H ₂ O	7,35 g
Frutose	13,51 g
Água destilada	1000 ml

- ❖ Morfologia espermática : para avaliação da morfologia espermática utilizou-se da técnica descrita por Pope *et al.* (1991) para coloração de espermatozóides. Esta técnica foi desenvolvida para avaliação de acrossomos, corando-o em azul escuro. Na ausência do acrossomo, a região apical da cabeça mostra-se rósea. A técnica consistiu na diluição de sêmen em citrato de sódio 2,9%, na proporção 9:1, seguida da adição de corante de “Pope” (1% rosa bengala, 1% *fast green* FCF e 40% etanol em uma solução tampão de fosfato dissódico 0,2M + ácido cítrico 0,1M) na proporção 1:1. A amostra permaneceu 70 segundos em temperatura ambiente, após os quais foi realizado um esfregaço em lâmina de vidro. A leitura da lâmina foi efetuada em microscópio óptico (400x e 1000x), anotando-se a ocorrência de espermatozóides normais e de cada defeito espermático. Os defeitos foram classificados em maiores e menores de acordo com a sua importância para a fertilidade (Barth e Oko, 1989) e os resultados expressos em porcentagem. Para os acrossomos, quaisquer alterações como irregularidade de contorno ou heterogeneidade na coloração foram consideradas defeitos.

5. CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN

5.1 Técnica de congelamento e diluentes

Depois da retirada das alíquotas destinadas às análises do sêmen *in natura*, o volume remanescente foi dividido de maneira eqüitativa em duas frações que foram centrifugadas a 300g por 10 minutos. O sobrenadante foi removido. Para suspensão dos espermatozóides utilizou-se os criodiluentes TRIS EQUEX GLICEROL (TEG) (Tabela 6) e MP-50 (Papa *et al.*, 2002) (Tabela 7). A divulgação dos valores quantitativos de cada ingrediente do meio MP-50 não foi autorizada pelos criadores da fórmula. O volume de cada diluente adicionado variou de acordo com a fórmula:

$$\text{Volume do diluente (mL)} = \frac{N}{2 \times (20 \times 10^6)}$$

Onde o N é o número total de espermatozóides móveis no ejaculado (concentração x volume do ejaculado x motilidade), 2 é o numero de diluentes utilizados para congelação e 20×10^6 é o número de espermatozóides que se deseja obter em 1 mL do diluente, com a finalidade de que cada palheta de 0,25 mL contenha 5 milhões de espermatozóides. Optou-se por trabalhar com uma concentração estipulada de espermatozóides por palheta para minimizar os efeitos desta variável na viabilidade espermática pós-criopreservação (Leipold *et al.*, 1998).

Após a diluição, o sêmen foi envasado em palhetas francesas (0,25 mL) e permaneceu em equilíbrio por 60 minutos em refrigerador de sêmen (Minitube[®], Alemanha) a 5°C. Durante os primeiros 50 minutos, as palhetas foram mantidas em um tubo de vidro inserido em um recipiente repleto de água (taxa média de 0,3°C/min); nos 10 minutos restantes,

permaneceram diretamente sobre a grade do refrigerador de sêmen (taxa média de 0,5°C/min). Após o equilíbrio, as amostras foram transferidas para caixa de isopor (18 x 15 x 22 cm³) e permaneceram durante 20 minutos em vapor de nitrogênio líquido, a 6 cm da coluna líquida, depois dos quais foram mergulhadas no mesmo. O sêmen congelado foi armazenado em botijão criogênico. Para as análises posteriores, as amostras de sêmen foram descongeladas a 46°C por 15 segundos, em banho-maria.

Tabela 6. Composição dos diluentes TRIS EQUEx (TE) (~ 330 mOsm) e TRIS EQUEx GLICEROL (TEG) utilizados respectivamente para a lavagem e congelação do sêmen de *Leopardus pardalis* e *L. tigrinus*.

	TE	TEG
<i>Componentes</i>		
Tris	2,4 g	2,4 g
Ácido cítrico	1.4 g	1.4 g
Glicose	0,8 g	0,8 g
Sulfato de amicacina	0,2 g	0,2 g
Gema de ovo	20 mL	20 mL
Equex	1 mL	1 mL
Água destilada e deionizada	para 100 mL	para 100 mL
Glicerol		7 mL

Tabela 7. Composição simplificada do diluente MP-50: componentes (Papa *et al.*, 2002).

<i>Grupo</i>	<i>Componentes</i>
Açúcares	Glicose, lactose, rafinose
Tampões	Citrato de sódio, citrato de potássio, EDTA
Substratos	Gema de ovo, leite em pó desnatado
Meios de cultivo celular	Hepes e DME-Dubelcco's Modified Eagle's
Antibiótico	Sulfato de amicacina
Crioprotetores intracelulares	Glicerol (3%), dimetil formamida (2%)

5.2 Análise do sêmen pós-descongelação

Depois de descongeladas, as amostras foram analisadas para motilidade e vigor espermáticos, morfologia espermática e integridade morfo-funcional da membrana plasmática por meio do teste hiposmótico e de sondas fluorescentes.

Coloração por sondas fluorescentes: a integridade da membrana foi avaliada pela técnica de coloração fluorescente, descrita por Harrison e Vickers (1990). Uma alíquota de sêmen foi diluída em solução de trabalho (1:4), contendo iodeto de propídio e diacetato de fluoresceína (Tabela 8).

Tabela 8. Composição da solução-trabalho utilizada para o teste de coloração de sondas fluorescentes e composição das soluções-estoque destinadas ao preparo da solução-trabalho, Botucatu, 2004.

<i>SOLUÇÃO-ESTOQUE</i>			<i>SOLUÇÃO TRABALHO</i>
DESCRIÇÃO	COMPOSIÇÃO	QUANTIDADE	
1. solução estoque de fluoresceína	Diacetato de carboxifluoresceína	9,2 mg	20 µL
	DMSO	20 mL	
2. Solução estoque de iodeto de propídeo	Iodeto de propídeo	10 mg	10 µL
	Solução fisiológica	20 mL	
3. Solução de formaldeído	Formalina a 40%	1%	10 µL
	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 dada pela porcentagem de células coradas em verde, ou seja, células com membrana plasmática íntegra. A coloração vermelha sinalizou a penetração do iodeto de propídeo no interior da célula, o que foi indicativo de lesão de membrana.

As demais análises efetuadas após a descongelação das amostras de sêmen estão descritas no item 4.3 do exame andrológico.

6. ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL

A análise ultraestrutural do espermatozóide foi realizada em dois momentos: *in natura* e após a descongelação. Realizamos um *pool* de sêmen *in natura* e outros dois *pools* após a descongelação (um de cada diluente) para cada espécie.

A fim de obter uma amostra mais concentrada e livre de meio ou plasma, o material foi centrifugado a 300g, por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e os espermatozóides foram suspensos em solução fixadora de glutaraldeído a 2,5% e tampão fosfato 0,1M (pH 7,4). Depois de fixado, o material foi mantido sob refrigeração a 5°C até o momento de ser processado.

O processamento foi executado da seguinte maneira:

- * Lavagem em tampão fosfatado 0,1M pH 7,3 (3 lavagens de 15 minutos)
- * Pós-fixação em tetróxido de ósmio 15 no mesmo tampão (2 horas)
- * Lavagem em água destilada (3 lavagens de 5 minutos)
- * Incubação em acetato de uralina 0,5% em solução aquosa (2 horas)
- * Desidratação em seqüência crescente de soluções de acetona (50, 70, 90 e 100%)
- * Embebição em resina (Araldite®) e acetona 100% (12 horas)
- * Embebição em resina na estufa a 37°C (1 hora)
- * Inclusão em resina e polimerização em estufa a 60°C (72 horas)
- * Trimagem
- * Seleção de campos desejados, com o uso de cortes semi-finos corados em azul de metileno 1% e azur II 1% em solução de bórax 1%
- * Obtenção de cortes ultrafinos, utilizando-se ultramicrotomo Ultratome III 880 da LKB

- * Coloração dos cortes ultrafinos com solução saturada de acetato de uranila em álcool 50% e posteriormente em citrato de chumbo.

Depois de preparadas e coradas, as grades foram analisadas em microscópio de transmissão (modelo CM100, Philips®). As células espermáticas foram selecionadas e fotografadas para análise das ultra-estruturas.

7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a comparação entre os diluentes de congelação, considerando a variação da resposta em relação ao momento *in natura* (avaliada em porcentagem, ou seja, a variação relativa), utilizou-se o teste não paramétrico de Wilcoxon (Norman e Streiner, 1994). Para a análise estatística dos dados obtidos pelas sondas fluorescentes, utilizou-se do mesmo teste, porém não foi necessário o cálculo da variação relativa, já que a análise não foi realizada no momento inicial.

A apresentação dos resultados foi realizada considerando as medidas descritivas de posição e variabilidade, seguidas do respectivo teste estatístico. O sinal negativo da medida descritiva indicou um decréscimo da variação (queda do valor do descongelado em relação ao *in natura*), enquanto o positivo, um acréscimo (elevação do valor do congelado em relação ao *in natura*).

O nível de confiança adotado para a significância entre os dados foi de 5% ($p < 0,05$). Quando se obteve um nível de confiança entre 5 e 10% ($0,05 < p < 0,10$), embora o resultado não fosse significativo, foi indicativo de necessidade de aumento do tamanho da amostra para uma definição mais objetiva. Quando o nível de confiança foi superior a 10% ($p > 0,10$), a diferença dos resultados foi considerada não significativa.

A análise das imagens obtidas em microscopia de transmissão foi estritamente descritiva.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Em termos anatômicos, os animais das espécies *Leopardus tigrinus* e *L. pardalis* apresentaram posicionamento de escroto e pênis idênticos ao gato doméstico (Popesko, 1985). O pênis mostrou, invariavelmente, um aumento de volume na porção mais apical da glândula (Figura 2), o que diferiu do aspecto cônico homogêneo descrito por Johnston *et al.* (2001) e visualizado na Figura 10. Na porção basal da glândula foram verificadas fileiras de



Figura 2. Pênis de *Leopardus pardalis* evidenciando a glândula. Em detalhe o aumento de volume na porção apical (Botucatu, 2004).

espículas queratinizadas, semelhantes às observadas no gato doméstico (Feldman e Nelson, 1996), provavelmente relacionadas ao estímulo mecânico que gera o fenômeno da ovulação induzida nas fêmeas das duas espécies (Morais, 1999; Moreira *et al.*, 2001).

Como o objetivo principal deste trabalho foi estudar o efeito da criopreservação sobre a célula espermática, priorizou-se a obtenção de sêmen em quantidade suficiente para o processamento. O protocolo sugerido por Howard (1993) foi mantido como base, porém, por vezes, sofreu alterações no número de séries e intensidade do estímulo, em função da resposta do animal. Por este motivo, as comparações efetuadas entre dados como volume do ejaculado, concentração espermática e número total de espermatozóides obtidos neste experimento, e dados expressos em literatura, não podem ser consideradas fidedignas.



Figura 3. Colheita de sêmen por eletroejaculação em *Leopardus pardalis*: observar o posicionamento simétrico dos membros pélvicos em sentido caudal em resposta ao estímulo elétrico, Botucatu, 2004.

2. GATO-DO-MATO-PEQUENO (*Leopardus tigrinus*)

Os gatos-do-mato-pequenos apresentaram o porte esperado para a espécie, em média 2,2 kg (Tabela 9), segundo Eisenberg e Redford (1992), porém inferior à média apresentada por Morais *et al.* (2002) -3,0 kg. Assim como em relação ao porte, a média do volume testicular total (VTT) foi inferior - 2,89 cm³ - ao relatado por Morais *et al.* (2002) - 4,2 cm³ - e também por Swanson *et al.* (1995) - 3,6 cm³. Quando se corrigiu o volume testicular para o peso (VTT/PC), porém, os valores obtidos para os animais deste experimento (1,35 cm³.kg⁻¹) praticamente se equivaleram aos dados obtidos por Morais *et al.* (2002) (1,4 cm³.kg⁻¹), mostrando que os animais são proporcionalmente semelhantes. Todos os testículos palpados apresentaram consistência fibroelástica.

Em relação ao aspecto do ejaculado, variou de translúcido a leitoso. O sêmen de aspecto leitoso mostrava-se mais denso. Em todas as ocasiões em que foi obtido, a concentração de espermatozóides no ejaculado foi alta (250 a 755 milhões sptz/mL). O sêmen avermelhado expressou contaminação por sangue. O amarelado foi indicativo de contaminação por urina.

Oito dos 15 ejaculados (53%) apresentaram contaminação por urina em pelo menos uma das séries, uma porcentagem extremamente elevada quando comparada à obtida por Morais (1999) – 26,9%. A contaminação do sêmen por urina é freqüente em felinos quando submetidos à eletroejaculação (Platz e Seager, 1978; Swanson *et al.*, 1996a; Morato, 1998; Morais, 1999) e pode estar relacionada ao posicionamento mais cranial do transdutor. No

presente estudo, embora se buscasse sempre o correto posicionamento e aprofundamento da probe, não foi possível evitar a contaminação. Acredita-se que, os fármacos utilizados, de maneira geral, apesar de terem propiciado um período de retorno anestésico mais tranquilo em relação ao obtido com o uso exclusivo do Zoletil®, causaram relaxamento excessivo do esfíncter do canal urinário, efeito indesejado para a colheita de sêmen. Observou-se, porém sem comprovação por análise estatística, que animais em planos anestésicos muito profundos ou muito superficiais e animais nos quais se utilizou associação de fármacos ao tartarato de butorfanol, a incidência de contaminação por urina foi maior.

Deve-se destacar um dado não descrito em literatura, a alteração de cor do sêmen poucos minutos após a ejaculação, passando de translúcido ou esbranquiçado à levemente róseo. A coloração rósea se mostrou homogênea em todo o frasco, levando a crer que esta modificação não tenha resultado de reação com o ar. Embora a hipótese seja especulativa e haja necessidade de estudos mais esclarecedores, acredita-se que possa estar relacionada ao metabolismo espermático.

Tabela 9. Médias ($\pm$ DP) de peso corporal (PC), volume testicular total (VTT), volume do ejaculado (VOL), pH e concentração espermática (CE) dos 15 ejaculados obtidos em cinco espécimes de *Leopardus tigrinus*, Botucatu, 2004.

ANIMAL	N*	PC (kg)	VTT (cm ³)	VOL (mL)	pH	CE ($\times 10^6$ spz/mL)
1	4	2,7 $\pm$ 0,5	2,9 $\pm$ 0,3	0,20 $\pm$ 0,19	7,6 $\pm$ 0,7	454,0 $\pm$ 352,2
2	1	1,8 $\pm$ 0,0	2,4 $\pm$ 0,0	0,05 $\pm$ 0,0	7,7 $\pm$ 0,0	105,0 $\pm$ 0,0
3	2	1,8 $\pm$ 0,0	2,2 $\pm$ 0,1	0,30 $\pm$ 0,14	7,5 $\pm$ 0,2	246,2 $\pm$ 199,7
4	5	2,4 $\pm$ 0,1	2,8 $\pm$ 0,3	0,13 $\pm$ 0,6	7,9 $\pm$ 0,6	169,5 $\pm$ 96,1
5	3	2,3 $\pm$ 0,1	4,0 $\pm$ 0,7	0,13 $\pm$ 0,6	7,8 $\pm$ 1,0	370,8 $\pm$ 323,2
médias		2,2 $\pm$ 0,4	2,9 $\pm$ 0,7	0,16 $\pm$ 0,1	7,7 $\pm$ 0,1	269,1 $\pm$ 143,1

* número de ejaculados por animal

Amostras sabidamente contaminadas por urina foram excluídas da mensuração de pH. A média obtida, 7,7 (Tabela 9), foi semelhante à encontrada na literatura para a espécie, 7,6 (Morais *et al.*, 2002). Os limites abrangeram de 7,0 a 9,0. As amostras com maior concentração de espermatozóides (acima de 700×10^6 spz/mL) apresentaram pH mais baixo (entre 7,0 e 7,1). As amostras cujas concentrações foram menores (66 a 265×10^6 spz/mL) apresentaram pH alcalino (8,3 a 9,0).

O volume do ejaculado, 0,16 mL (Tabela 9), foi inferior ao obtido por Morais *et al.* (2002) – 0,30 mL - e maior que o volume relatado por Swanson *et al.* (1995) – 0,11 mL. As variáveis concentração e número total de espermatozóides móveis no ejaculado (obtido pela fórmula: concentração espermática x volume ejaculado) seguiram o mesmo padrão, sendo os valores obtidos – 269 spz/mL e 35×10^6 spz móveis - intermediários entre os valores apresentados em literatura – 412 spz/mL e $74,2 \times 10^6$ spz móveis (Morais *et al.*, 2002) – e – 78,5 spz/mL e $9,4 \times 10^6$ spz totais (Swanson *et al.*, 1995).

Utilizando-se da relação número de espermatozóides, dividido por volume testicular total (NTE/VTT) verifica-se que os animais do presente estudo produziram em média, menos espermatozóides por volume testicular ($12,1 \times 10^6$ spz/cm³) que os estudados por Morais *et al.* (2002) ($17,7$ spz/cm³). Vários fatores como genética, sazonalidade, diferenças nos protocolos de anestesia, colheita de sêmen, dieta, idade dos animais e condições de cativeiro podem ter influenciado a menor produção espermática nestes animais.

Todas estas comparações que envolvem volume e número total de espermatozóides no ejaculado, entretanto, são especulativas, ainda quando desconsideramos a diferença dos protocolos para eletroejaculação. Dooley *et al.* (1991), demonstraram que a ejaculação

retrógrada no gato doméstico acontece durante o acasalamento ou a eletroejaculação. Embora a ejaculação retrógrada seja, portanto, fisiológica, a contaminação do sêmen por urina, como um fenômeno inverso, não o é. Aventa-se aqui a hipótese de que, assim como foi obtida uma alta taxa de contaminação por urina devido ao relaxamento do esfíncter uretral, o refluxo de sêmen para a vesícula urinária pode também ter sido alto neste experimento, resultando em diminuição de volume e número de espermatozóides no ejaculado.

Tabela 10. Valores médios ($\pm$ DP) das análises do sêmen *in natura* e pós-descongelado nos meios TEG e MP-50 para *Leopardus tigrinus* (n = 5, 15 ejaculados): motilidade espermática (Mot), vigor espermático (V), teste hiposmótico (H), sondas fluorescentes (F), espermatozóides morfolologicamente normais (N), Botucatu, 2004.

MOMENTO	Mot (%)	V (0-5)	H (%)	F (%)	N (%)
<i>in natura</i>	76,27 $\pm$ 15,3	4,12 $\pm$ 1,0	82,42 $\pm$ 8,9	-	52,01 $\pm$ 12,5
TEG	37,69 $\pm$ 12,5	2,74 $\pm$ 0,8	59,06 $\pm$ 13,0	39,65 $\pm$ 6,2	37,50 $\pm$ 8,7
MP-50	27,52 $\pm$ 13,2	2,60 $\pm$ 0,5	60,24 $\pm$ 5,6	39,10 $\pm$ 4,0	30,54 $\pm$ 11,3

O sêmen *in natura* apresentou uma motilidade espermática (76,27%) e vigor espermático (4,12) ligeiramente maiores que os descritos em literatura (73,5% e 3,4) (Morais *et al.*, 2002). Quando calculado o Índice de Motilidade Progressiva (IMP), obtido pela fórmula:

$$\text{IMP} = \frac{\text{Mot} + (\text{V} \times 20)}{2}$$

Onde Mot é a porcentagem de espermatozóides móveis, V é o vigor espermático, tem-se que o IMP obtido (79,3) é superior aos encontrados por Moraes *et al.*, 2002 (74,1) e Swanson *et al.*, 1995 (62,1). Estes dados indicaram que a presença de urina nem sempre resultou em queda de motilidade espermática.

O sêmen apresentou uma porcentagem relativamente baixa de espermatozóides morfolologicamente normais - 52% (Tabela 10) (Figura 5a) o que, entretanto, não divergiu demasiadamente da média encontrada por Moraes *et al.* (2002) - 59,2%, mas foi maior que a média obtida por Swanson *et al.* (1995) - 35,6%. Os defeitos concentraram-se em alterações de flagelo como cauda enrolada, dobrada e fortemente enrolada (12,5%, 10,9% e 10,95%, respectivamente) (Figura 5d). Swanson *et al.* (1996^a), obtiveram altas porcentagens de espermatozóides com caudas enroladas e dobradas em sêmen de jaguatirica contaminado por urina.

A osmolaridade média dos fluidos corporais é basicamente a mesma, de 280 a 310 mOsm/kg para a urina do gato doméstico (Osborne e Finco, 1995), e de 290 a 323 mOsm/kg para o sêmen da mesma espécie (Johnston *et al.*, 1988). Osborne e Finco (1995) relataram, porém, que a osmolaridade da urina pode variar amplamente no gato (50 a 3200 mOsm/kg). Sabe-se que o meio hiposmótico causa influxo de água em membranas funcionais e conseqüente edema. O edema no espermatozóide é notado pelo enrolamento da cauda (Neild *et al.*, 1999). Portanto, a exposição de espermatozóides a uma urina hiposmótica poderia explicar o aumento de incidência de alterações de flagelo neste experimento.

Axnér *et al.* (1997), verificaram que os espermatozóides obtidos na primeira série da eletroejaculação apresentavam uma quantidade elevada de defeitos de flagelo (cauda enrolada e dobrada). Após este relato, grande parte dos trabalhos que utilizam avaliações de morfologia espermática em felinos retira uma amostra da segunda fração do ejaculado para destinar a esta análise. Em nosso estudo, a alíquota de sêmen destinado ao exame morfológico foi extraída do volume total do ejaculado, e não da segunda série da eletroejaculação, uma vez que se pretendeu avaliar o ejaculado como um todo, ou da maneira como é inseminado ou

criopreservado. Talvez também por este fato, tenha-se obtido uma quantidade relativa maior de defeitos menores ligados ao flagelo.

Tabela 11. Médias ($\pm$ DP) das porcentagens de espermatozóides morfolologicamente normais e de espermatozóides pleiomórficos no sêmen *in natura* e após a descongelação nos diluentes TEG e MP-50 em *Leopardus tigrinus* (n = 5, 15 ejaculados), Botucatu, 2004.

	<i>In natura</i>	<i>TEG</i>	<i>MP-50</i>
Espermatozóides normais (%)	52,01 $\pm$ 12,5	37,53 $\pm$ 8,7	30,94 $\pm$ 10,0
Defeitos maiores (%)	21,84 $\pm$ 9,3	29,70 $\pm$ 8,2	28,52 $\pm$ 6,1
Cabeça estreita (%)	0,38 $\pm$ 0,4	0,00 $\pm$ 0,0	0,00 $\pm$ 0,0
Contorno anormal de cabeça (%)	0,67 $\pm$ 0,8	0,04 $\pm$ 0,1	0,00 $\pm$ 0,0
Cabeça destacada anormal (%)	0,90 $\pm$ 0,8	0,07 $\pm$ 0,1	0,11 $\pm$ 0,1
Microcefalia (%)	0,14 $\pm$ 0,2	0,21 $\pm$ 0,2	0,04 $\pm$ 0,1
Formas duplas (%)	0,15 $\pm$ 0,2	0,00 $\pm$ 0,0	0,04 $\pm$ 0,1
Defeito de acrossomo (%)	3,42 $\pm$ 2,1	17,06 $\pm$ 7,7	15,22 $\pm$ 5,0
Defeito de peça intermediária (%)	1,47 $\pm$ 1,0	1,34 $\pm$ 1,6	0,70 $\pm$ 0,9
Cauda fortemente dobrada (%)	1,24 $\pm$ 1,0	1,47 $\pm$ 1,5	0,58 $\pm$ 0,7
Cauda fortemente enrolada (%)	10,95 $\pm$ 9,3	7,90 $\pm$ 4,2	10,06 $\pm$ 7,0
Fratura total da cauda (%)	0,22 $\pm$ 0,4	0,17 $\pm$ 0,2	0,00 $\pm$ 0,0
Gota citoplasmática proximal (%)	2,50 $\pm$ 1,8	1,34 $\pm$ 1,4	1,57 $\pm$ 1,1
Defeitos menores	26,15 $\pm$ 8,9	32,80 $\pm$ 7,8	40,52 $\pm$ 8,9
Cabeça destacada normal (%)	0,73 $\pm$ 0,5	0,50 $\pm$ 0,5	1,34 $\pm$ 1,0
Inserção anormal (%)	0,36 $\pm$ 0,2	0,38 $\pm$ 0,3	0,56 $\pm$ 0,3
Cauda enrolada (%)	12,50 $\pm$ 5,8	15,03 $\pm$ 7,0	19,05 $\pm$ 9,0
Cauda dobrada (%)	10,90 $\pm$ 4,0	16,24 $\pm$ 2,3	17,59 $\pm$ 5,2
Gota citoplasmática distal (%)	1,70 $\pm$ 1,8	1,27 $\pm$ 1,5	1,96 $\pm$ 1,0

Morais (1999), encontrou uma porcentagem bastante alta de espermatozóides com peça intermediária dobrada com gota citoplasmática (18,7%), que, embora seja um defeito de

maturação epididimária, é considerado um defeito maior (Barth e Oko, 1989). No presente estudo este defeito foi relativamente menos comum (1,47%) (Figura 5b), porém obteve-se uma porcentagem elevada de espermatozóides com caudas fortemente enroladas (10,95%) (Figura 5c), que também é considerado um defeito maior, isto é, um defeito que causa maior impacto na capacidade fertilizante do sêmen (Barth e Oko, 1989) (Tabela 11).

Em relação à eficiência dos dois diluentes utilizados para a congelação do sêmen, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as análises efetuadas, motilidade espermática, vigor, teste hiposmótico, morfologia espermática e sondas fluorescentes (Tabelas 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18). Apesar de não diferirem estatisticamente, ao comparar as médias obtidas após a descongelação, observamos que o diluente TEG proporcionou uma queda menor de motilidade em 10 pontos percentuais em relação ao diluente MP-50 (Tabela 10). Provavelmente, se o número de animais ($n = 5$) do experimento fosse maior, esta diferença poderia se configurar significativa.

Tabela 12. Medidas descritivas para a motilidade espermática de *Leopardus tigrinus*, segundo a variação relativa (%) dos momentos *in natura* e pós-descongelado, nos diluentes TEG e MP-50, Botucatu, 2004.

Medida Descritiva	Diluyente		Resultado do Teste Estatístico
	TEG	MP50	
Média	-50,43	-63,65	10,00 ($p > 0,10$)
Desvio Padrão	13,01	19,63	
Valor Mínimo	-68,75	-93,75	
Mediana	-50,00	-56,94	
Valor Máximo	-37,97	-42,02	

De qualquer forma, devido à não divergência estatística dos dados, foi possível traçar médias para os valores obtidos após a descongelação do sêmen proveniente dos dois meios (TEG e MP-50), com a finalidade de discutir a relação entre os momentos *in natura* e pós-descongelação. Os parâmetros avaliados expressaram uma queda acentuada na qualidade de sêmen após a descongelação (Tabela 10). A motilidade espermática caiu 43,7 pontos percentuais (ou em valores absolutos). Suspeita-se que, embora a motilidade do ejaculado contaminado por urina possa ter sido mantida em um primeiro momento, como observou Dooley *et al.* (1991) para gatos domésticos, é possível que o choque osmótico, de pH, e/ou tóxico possa ter causado alterações primárias nas membranas espermáticas, tornando-as mais susceptíveis aos estresses gerados pelo processo de congelação e descongelação. Entretanto, quedas similares na porcentagem de espermatozóides móveis já foram relatadas para outras espécies de felinos (Wildt *et al.*, 1987b; Zambelli *et al.*, 2002; Tsutsui *et al.*, 2003).

Tabela 13. Medidas descritivas para o vigor espermático de *Leopardus tigrinus*, segundo a variação relativa (%) dos momentos *in natura* e pós-descongelado, nos diluentes TEG e MP-50, Botucatu, 2004.

Medida Descritiva	Diluyente		Resultado do Teste Estatístico
	TEG	MP50	
Média	-32,99	-36,46	1,00 (p > 0,10))
Desvio Padrão	12,61	13,34	
Valor Mínimo	-50,00	50,00	
Mediana	-30,00	-40,00	
Valor Máximo	-16,67	-16,67	

Em relação à morfologia, obteve-se um aumento no percentual de caudas enroladas e dobradas (10,5 pontos), assim como das lesões de acrosso (12,7 pontos) após a descongelação do sêmen (Figuras 5d e 5e). Segundo Lin *et al.* (1998), defeitos de flagelo, como o enrolamento, são freqüentemente observados em resposta ao processo de criopreservação.

Tabela 14. Medidas descritivas para a morfologia espermática – espermatozóides normais - de *Leopardus tigrinus*, segundo a variação relativa (%) dos momentos *in natura* e pós-descongelado, nos diluentes TEG e MP-50, Botucatu, 2004.

<i>Medida Descritiva</i>	<i>Diluyente</i>		<i>Resultado do Teste Estatístico</i>
	<i>TEG</i>	<i>MP50</i>	
Média	-22,78	-47,27	0,00 (p > 0,10)
Desvio Padrão	18,82	-14,51	
Valor Mínimo	-48,73	-66,85	
Mediana	-27,84	-43,17	
Valor Máximo	-3,70	-31,94	

Tabela 15. Medidas descritivas para a morfologia espermática – defeitos menores - de *Leopardus tigrinus*, segundo a variação relativa (%) dos momentos *in natura* e pós-descongelado, nos diluentes TEG e MP-50, Botucatu, 2004.

<i>Medida Descritiva</i>	<i>Diluyente</i>		<i>Resultado do Teste Estatístico</i>
	<i>TEG</i>	<i>MP50</i>	
Média	33,21	67,30	2,00 (p > 0,10)
Desvio Padrão	25,74	60,08	
Valor Mínimo	6,94	22,72	
Mediana	26,47	47,22	
Valor Máximo	73,46	164,71	

Tabela 16. Medidas descritivas para a morfologia espermática – defeitos maiores - de *Leopardus tigrinus*, segundo a variação relativa (%) dos momentos *in natura* e pós-descongelado, nos diluentes TEG e MP-50, Botucatu, 2004.

<i>Medida Descritiva</i>	<i>Diluyente</i>		<i>Resultado do Teste Estatístico</i>
	<i>TEG</i>	<i>MP50</i>	
Média	55,02	49,99	10,00 (p > 0,10)
Desvio Padrão	74,42	63,09	
Valor Mínimo	-17,24	-27,59	
Mediana	54,17	62,59	
Valor Máximo	170,42	125,35	

Os felinos, de forma geral, parecem ser especialmente sensíveis às lesões de acrossomo induzidas pelo frio (Pukazhenth, 1999; Leibo e Songsasen, 2001). O sêmen do gato-do-mato-pequeno, quando avaliado pela técnica de coloração de “Pope”, mostrou que o defeito mais incidente após a descongelação foi de fato a lesão acrossômica (média de 16,14%). Outras espécies apresentaram proporções maiores de alterações de acrossomo após a descongelação do sêmen, como jaguatirica, 50-60% (Swanson *et al.*, 1996a), onças-pintadas e guepardos, aproximadamente 70% (Swanson *et al.*, 1996b), e os gatos domésticos, 60-80% (Hay e Goodrowe, 1993). Deve-se observar, entretanto, que a contagem de defeitos acrossomais realizada neste estudo foi relativa, levando-se em consideração todas as alterações espermáticas, enquanto nos demais estudos citados a avaliação do acrossomo foi uma análise isolada.

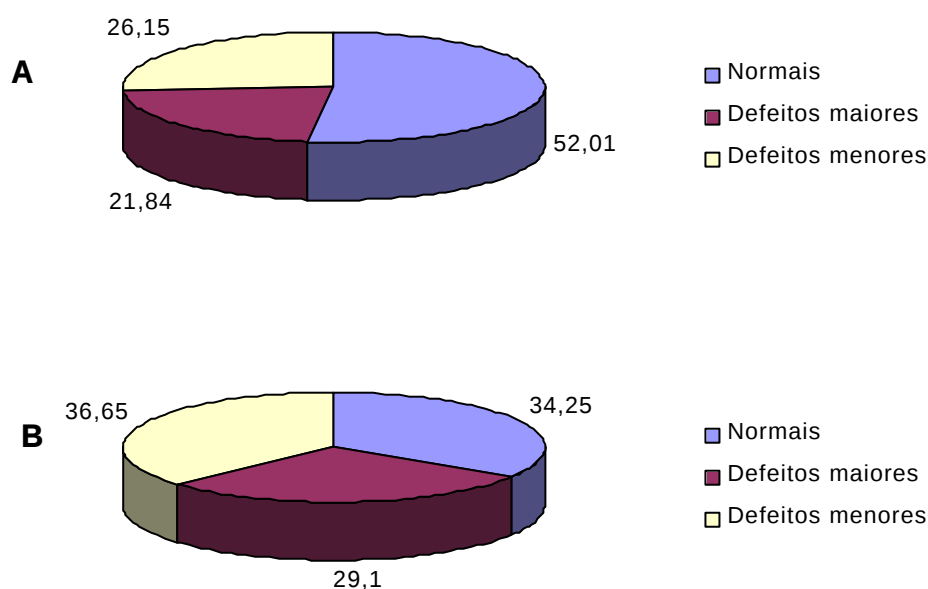


Figura 4. Representação gráfica dos resultados obtidos na análise da morfologia espermática de *Leopardus tigrinus* nos momentos *in natura* (A) e após a criopreservação (B) (médias dos resultados obtidos utilizando-se os diluidores TEG e MP-50), Botucatu, 2004.

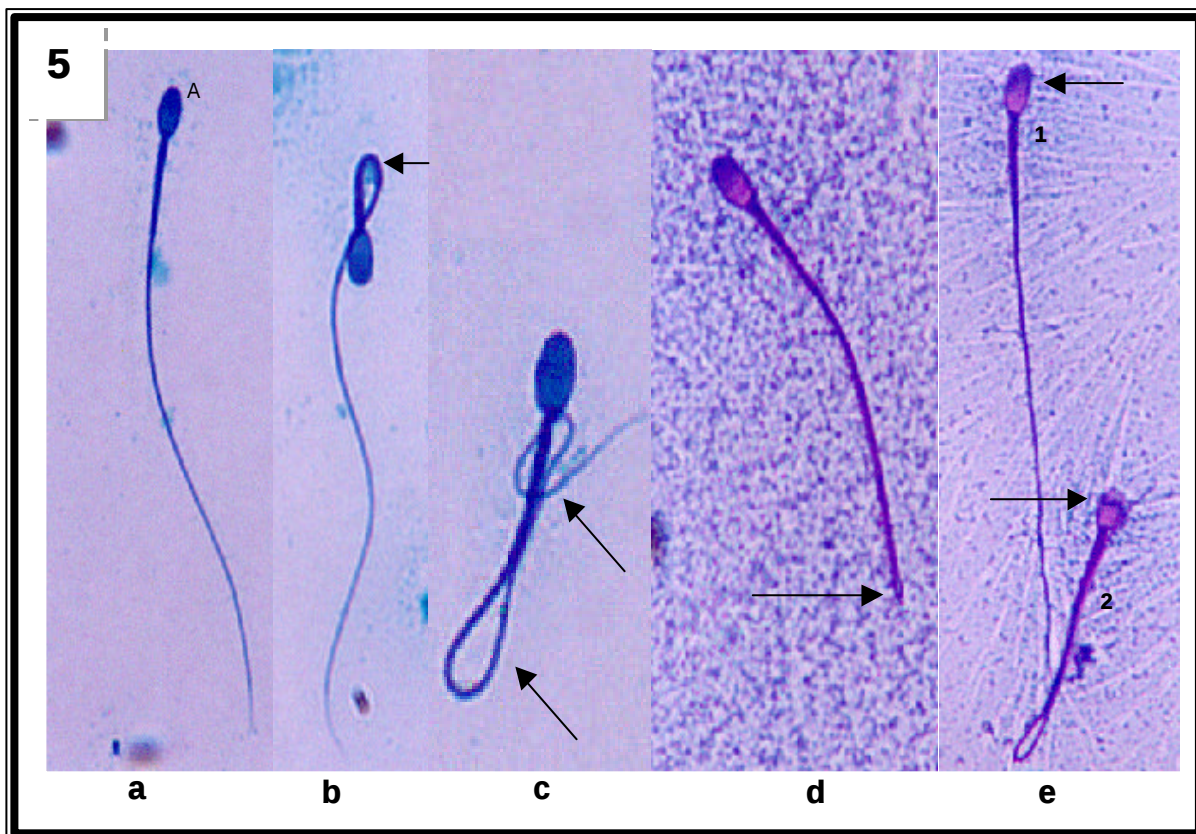


Figura 5 Morfologia espermática em sêmen *in natura* (IN) ou criopreservado (C) de *Leopardus tigrinus*, utilizando-se a coloração simples de “Pope” (Pope *et al.*, 1991), em microscopia óptica, 1000x. a) Espermatozóide normal (IN); notar acrossomo intacto (A). b) Espermatozóide com defeito de peça intermediária (dobrada) (IN). c) Cauda duplamente enrolada (IN). d) Cauda dobrada e acrossomo intacto (C). e¹) Contorno anormal de acrossomo, (C). e²) Cauda dobrada e destacamento de acrossomo (C), Botucatu, 2004.

A análise do teste hiposmótico, como já relatado, não diferiu entre os criodiluentes (Tabela 17) e teve uma queda média de 22,7 pontos percentuais em relação ao momento *in natura* (Tabela 10). Os resultados obtidos por este teste não representaram a porcentagem de células com integridade funcional da membrana plasmática, em nenhum dos dois momentos (pré e pós-congelação). Conforme já discutido, a solução hiposmótica causa edema no espermatozóide com membrana plasmática funcional, o que resulta em enrolamento de cauda. Neste estudo, a porcentagem de espermatozoides com caudas morfologicamente

enroladas ou dobradas foi elevada. Para que estes espermatozóides fossem desconsiderados como funcionais seria necessária a realização de uma etapa complementar nesta análise, a diluição do sêmen em solução isosmótica (Lin *et al.*, 1998), subtraindo-se os espermatozóides que apresentassem cauda enrolada. Embora o teste hiposmótico seja de fácil preparo e requeira somente um microscópio óptico para a leitura, ele demanda tempo e, portanto, não se mostrou muito prático para utilização a campo.

Tabela 17. Medidas descritivas para o teste hiposmótico de *Leopardus tigrinus*, segundo a variação relativa (%) após o processo de criopreservação de sêmen nos diluentes TEG e MP-50, Botucatu, 2004.

<i>Medida Descritiva</i>	<i>Diluyente</i>		<i>Resultado do Teste Estatístico</i>
	<i>TEG</i>	<i>MP50</i>	
Média	-28,41	-26,52	7,00 (p > 0,10))
Desvio Padrão	12,60	6,69	
Valor Mínimo	-42,07	-33,52	
Mediana	-33,80	-28,05	
Valor Máximo	-14,21	-15,43	

A análise de integridade morfo-funcional da membrana plasmática por sondas fluorescentes não foi realizada em um primeiro momento, portanto, não se pôde discutir o quanto se perdeu em integridade após a criopreservação. O valor obtido para o gato-do-mato-pequeno (média de 39,4% de espermatozóides com membrana íntegra após a descongelação) foi intermediário entre valores obtidos para sêmen criopreservado de cães, entre 21% e 74% (Ström *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 2002; Chirinéa *et al.*, 2003) e para eqüinos, entre 30 e 55% (Aurich *et al.*, 1996; Neild *et al.*, 1999; Papa *et al.*, 2002).

Tabela 18. Medidas descritivas para a integridade de membrana por sondas fluorescentes de *Leopardus tigrinus*, segundo a porcentagem (%) obtida após o processo de criopreservação de sêmen nos diluentes TEG e MP-50, Botucatu, 2004.

<i>Medida Descritiva</i>	<i>Diluyente</i>		<i>Resultado do Teste Estatístico</i>
	<i>TEG</i>	<i>MP50</i>	
Média	39,64	39,07	1,00 (P > 0,10)
Desvio Padrão	6,23	3,94	
Valor Mínimo	30,50	33,50	
Mediana	41,25	40,50	
Valor Máximo	47,50	43,38	

3. JAGUATIRICAS (*Leopardus pardalis*)

As jaguatiricas estudadas tiveram média de peso corporal de 13,1 kg, o que está dentro dos padrão descrito para a espécie (Novak e Paradiso, 1991). Ao exame dos órgãos genitais externos, os testículos apresentaram consistência fibroelástica em 15 das 17 colheitas. As alterações de consistência não foram permanentes e estiveram relacionadas a lesões de pele no escroto. Também não estiveram relacionadas com queda na qualidade do sêmen na respectiva colheita, nem nas subseqüentes. O volume testicular médio obtido, 27,21 cm³, foi inferior ao obtido por Morais *et al.* (2002), 32 cm³.

A relação obtida pelo cálculo do volume testicular total pelo peso corporal (VTT/PC), 2,07 cm³.kg⁻¹, foi semelhante à obtida por Morais *et al.* (2002), 2,3 cm³.kg⁻¹, o que confirma que há proporcionalidade específica entre gônadas e porte corporal. Em geral, os valores desta relação são mais altos para as espécies do gênero *Leopardus* que para outras espécies de felinos já estudadas (Barone *et al.*, 1994; Swanson *et al.*, 1995; Morais *et al.*, 2002). Os testículos proporcionalmente maiores nessas espécies garantem uma eficiência maior na produção de espermatozóides por kilo de peso corporal (Morais, 1999).

Os ejaculados de jaguatiricas apresentaram coloração levemente amarelada a esbranquiçada. Um dos animais ejaculou sêmen com coloração enegrecida e consistência oleosa em duas colheitas consecutivas, com um intervalo de 35 dias. Ao microscópio, observou-se que os

espermatozoides provenientes destes ejaculados apresentaram boa motilidade (70 e 85%) e vigor excelente (5), além de uma concentração (507,5 e 300,0 milhões sptz/mL) acima da média obtida para a espécie (164,2 sptz/mL) (Tabela 19) . Outras alterações de cor estiveram ligadas à contaminação por sangue (avermelhado) e urina (amarelo).

Foi difícil quantificar a contaminação do sêmen por urina, já que os ejaculados mostraram-se amarelados em 59% das colheitas, apesar de apresentarem motilidade e vigor espermáticos muito bons (Tabela 20). Moraes (1999), baseando-se na cor e pH do ejaculado, constatou que 69% dos 42 ejaculados obtidos de jaguatirica estavam contaminados por urina, porém também obteve bons índices de motilidade progressiva para o sêmen dos quatro machos estudados (75,4 a 79,3). Supõe-se que o sêmen da espécie seja mais resistente às alterações provocadas pela contaminação por urina, talvez porque estas alterações não sejam tão limitantes, isto é, o pH da urina pode não ser tão ácido ou a osmolaridade possa ser similar à do sêmen, minimizando os danos aos espermatozoides. Outra possibilidade é que o sêmen da espécie possa apresentar fisiologicamente uma coloração amarelada no ejaculado.

Tabela 19. Médias ($\pm$ DP) de peso corporal (PC), volume testicular total (VTT), volume do ejaculado (VOL), pH e concentração espermática (CE) para cinco espécimes de *Leopardus pardalis*, Botucatu, 2004.

ANIMAL	N*	PC(kg)	VTT(cm ³)	VOL(mL)	pH	CE($\times 10^6$ sptz/mL)
1	3	14,3 $\pm$ 1,1	38,8 $\pm$ 1,7	0,92 $\pm$ 0,5	7,6 $\pm$ 0,7	151,25 $\pm$ 107,2
2	3	11,8 $\pm$ 0,7	26,47 $\pm$ 1,0	0,76 $\pm$ 0,1	6,7 $\pm$ 0,1	145,42 $\pm$ 58,9
3	4	14,1 $\pm$ 1,2	22,912 $\pm$ 1,6	0,76 $\pm$ 0,3	7,4 $\pm$ 0,4	99,06 $\pm$ 14,6
4	3	10,5 $\pm$ 0,5	27,42 $\pm$ 2,4	0,22 $\pm$ 0,07	6,6 $\pm$ 0,5	349,16 $\pm$ 140,3
5	4	14,7 $\pm$ 0,6	20,44 $\pm$ 2,3	0,35 $\pm$ 0,2	7,9 $\pm$ 1,0	76,56 $\pm$ 35,2
médias		13,10 $\pm$ 1,8	27,21 $\pm$ 7,0	0,60 $\pm$ 0,3	7,2 $\pm$ 0,6	164,29 $\pm$ 108,0

* número de ejaculados/animal

O pH médio do ejaculado (7,2) (Tabela 19) esteve próximo ao da média obtida por Morais (1999) para a espécie (7,5). Dentre os 17 ejaculados, entretanto, os valores limítrofes foram 6,1 e 9. O animal que apresentou a menor média de pH (6,6) foi o que mostrou maior concentração espermática (349,16), assim como o que apresentou o valor mais elevado de pH (7,9), a menor concentração espermática (76,56). Poder-se-ia esperar que o sêmen proveniente da eletroejaculação expressasse alcalinidade, devido à estimulação direta na região da próstata (Axnèr e Linde-Fosberg, 2002), porém, a participação da secreção prostática no ejaculado parece ter sido variável de acordo com o indivíduo e, como já discutido, não se pôde avaliar com clareza a porcentagem total de amostras contaminadas com urina, o que também deve ter sido uma das causas para obtenção de pH mais ácido em alguns ejaculados.

A média de volume do ejaculado (0,60 mL) foi inferior ao obtido por Morais *et al.*, 2002 (1,40 mL), porém, equiparou-se ao relatado por Swanson *et al.*, 1995 (0,62 mL), e superou o valor obtido por Howard, 1993 (0,30 mL). A concentração espermática ($164,2 \times 10^6$ spz/mL) foi superior ao descrito nestes três estudos ($101,2$; $53,8$; $28,0 \times 10^6$ spz/mL, respectivamente). A média do número de espermatozóides móveis por ejaculado encontrada neste estudo, $84,3 \times 10^6$, foi inferior ao valor obtido por Morais *et al.* (2002), de $114,7 \times 10^6$ spz móveis, mas foi 10 vezes maior que a relatada por Howard (1993), e pouco mais de duas vezes maior que a obtida por Swanson *et al.* (1995). Convém lembrar que o protocolo de colheita utilizado neste experimento foi, por vezes, diferenciado dos utilizados nos estudos aqui comparados.

O sêmen *in natura* da jaguatirica apresentou uma motilidade espermática média muito boa (85,6%) e um excelente escore para motilidade progressiva (4,6) (Tabela 20). Transpondo estes dados para o índice de motilidade progressiva (IMP), obtém-se um valor (89,1) acima dos já descritos em literatura (76,0; 70,4; 83,1 e 77,5), por Howard (1993); Swanson *et al.*

(1995); Swanson *et al.* (1996a) e Morais *et al.* (2002), respectivamente. Todos estes dados, porém, são subjetivos e pouco discrepantes e sugerem que a espécie tenha uma boa qualidade seminal.

A porcentagem de espermatozóides morfolologicamente normais (70,4%) encontrada para a espécie (Tabelas 20 e 21) está acima da média apresentada pela maioria dos felinos (Howard, 1993) e se assemelha ao valor obtido por Morato *et al.*, 2001, para onças-pintadas (*Panthera onca*) de vida livre (73,5%). Outros autores mostraram resultados ainda melhores (acima de 80%) para a espécie (Howard, 1993; Morais *et al.*, 2002).

Tabela 20. Valores médios ($\pm$ DP) das análises do sêmen *in natura* e pós-descongelado nos meios TEG e MP-50 de *Leopardus pardalis* (n = 5, 17 ejaculados) para: motilidade espermática (Mot), vigor espermático (V), teste hiposmótico (H), sondas fluorescentes (F), espermatozóides morfolologicamente normais (N), Botucatu, 2004.

MOMENTO	Mot (%)	V (0-5)	H (%)	F (%)	N (%)
<i>in natura</i>	85,60 $\pm$ 3,8	4,60 $\pm$ 0,3	79,80 $\pm$ 7,0	-	70,40 $\pm$ 15,6
TEG	73,10 $\pm$ 3,4	3,60 $\pm$ 0,2	51,90 $\pm$ 2,1	47,50 $\pm$ 3,1	47,90 $\pm$ 11,6
MP-50	61,00 $\pm$ 9,2	3,80 $\pm$ 0,2	57,60 $\pm$ 5,4	38,70 $\pm$ 2,5	43,90 $\pm$ 16,0

De fato, os defeitos que mais incidiram na análise realizada pela coloração de “Pope”, foram novamente os defeitos de flagelo (13,3% de caudas dobradas e enroladas e 4,4% fortemente enroladas) (Tabela 21) (Figura 7b). Morais *et al.*, 2002, obtiveram uma porcentagem bastante inferior de caudas enroladas ou dobradas (0,6%), porém uma quantidade relativamente maior de defeitos de peça intermediária (7,8% contra 1,3%) (Figura 7c). Além de todas as variáveis já discutidas para o gato-do-mato-pequeno em relação à alta incidência de caudas dobradas e enroladas, suspeita-se que durante o preparo do sêmen para a coloração de “Pope”, possa ter

ocorrido choque osmótico, influenciando a resposta. Como já mencionado, a técnica de coloração utilizada foi desenvolvida para verificar o *status* do acrossomo, e não é regularmente utilizada para avaliação dos demais defeitos espermáticos.

Tabela 21. Médias ($\pm$ DP) das porcentagens de espermatozóides morfologicamente normais e de espermatozóides pleiomórficos no sêmen *in natura* e após a descongelação em meio TEG e MP-50, em *Leopardus pardalis* (n = 5, 17 ejaculados), Botucatu, 2004.

	<i>In natura</i>	<i>TEG</i>	<i>MP-50</i>
Espermatozóides normais (%)	70,40 $\pm$ 15,6	47,90 $\pm$ 11,6	43,90 $\pm$ 16,0
Defeitos maiores (%)	13,20 $\pm$ 10,3	36,90 $\pm$ 5,7	38,90 $\pm$ 10,0
Cabeça estreita (%)	0,13 $\pm$ 0,1	0,00 $\pm$ 0,0	0,00 $\pm$ 0,0
Cabeça piriforme (%)	0,06 $\pm$ 0,1	0,00 $\pm$ 0,0	0,00 $\pm$ 0,0
Contorno anormal de cabeça (%)	1,13 $\pm$ 0,8	0,53 $\pm$ 0,5	0,36 $\pm$ 0,4
Cabeça destacada anormal (%)	0,16 $\pm$ 0,2	0,05 $\pm$ 0,1	0,23 $\pm$ 0,3
Microcefalia (%)	0,33 $\pm$ 0,4	0,00 $\pm$ 0,0	0,06 $\pm$ 0,1
Formas duplas (%)	0,00 $\pm$ 0,0	0,00 $\pm$ 0,0	0,06 $\pm$ 0,1
Defeito de acrossomo (%)	4,08 $\pm$ 2,6	30,38 $\pm$ 3,6	31,53 $\pm$ 4,6
Defeito de peça intermediária (%)	1,30 $\pm$ 1,2	1,54 $\pm$ 1,1	1,80 $\pm$ 1,8
Cauda fortemente dobrada (%)	0,51 $\pm$ 0,4	0,40 $\pm$ 0,3	0,50 $\pm$ 0,5
Cauda fortemente enrolada (%)	4,40 $\pm$ 7,3	2,90 $\pm$ 3,3	3,90 $\pm$ 4,1
Fatura total da cauda (%)	0,03 $\pm$ 0,1	0,17 $\pm$ 0,1	0,06 $\pm$ 0,1
Gota citoplasmática proximal (%)	0,95 $\pm$ 0,7	0,95 $\pm$ 1,0	0,38 $\pm$ 0,4
Defeitos menores	16,35 $\pm$ 6,2	15,00 $\pm$ 9,3	17,20 $\pm$ 8,3
Cabeça destacada normal (%)	0,05 $\pm$ 0,1	0,48 $\pm$ 0,7	0,47 $\pm$ 0,3
Inserção anormal (%)	0,34 $\pm$ 0,2	0,90 $\pm$ 0,5	0,90 $\pm$ 0,4
Cauda enrolada (%)	6,60 $\pm$ 3,3	5,40 $\pm$ 3,6	6,00 $\pm$ 4,2
Cauda dobrada (%)	6,70 $\pm$ 3,0	6,90 $\pm$ 3,3	7,80 $\pm$ 1,5
Gota citoplasmática distal (%)	2,60 $\pm$ 1,5	1,30 $\pm$ 1,8	2,05 $\pm$ 2,3

Outra classe de defeitos com ocorrência razoavelmente alta foi a de alterações de acrossomo, que se concentraram em espermatozóides com destacamento parcial ou total de acrossomo (4,4%) (Tabela 21), algumas vezes associado com defeito de peça intermediária (Figura 7d).

Após a criopreservação, a análise estatística revelou que não houve diferença significativa para o nível de significância estipulado em 5% entre os dois diluentes nas análises efetuadas. Entretanto, em um nível de confiança entre cinco e 10% ($0,5 < p < 0,10$), os resultados obtidos em motilidade espermática e vigor espermático (Tabelas 22 e 23) representaram um indicativo biológico para um número amostral reduzido, ou seja, uma “tendência” para melhor motilidade espermática em meio TEG e melhor vigor em meio MP-50 (Tabela 20).

Tabela 22. Medidas descritivas para a motilidade espermática de *Leopardus pardalis*, segundo a variação relativa (%) dos momentos *in natura* e pós-descongelado, nos diluentes TEG e MP-50, Botucatu, 2004.

Medida Descritiva	Diluyente		Resultado do Teste Estatístico
	TEG	MP50	
Média	-14,34	-28,30	15,00 ($0,05 < p < 0,10$)
Desvio Padrão	7,94	11,06	
Valor Mínimo	-26,03	-45,21	
Mediana	-14,81	-25,92	
Valor Máximo	-4,09	-16,33	

A motilidade mostrou uma queda em pontos percentuais (ou queda absoluta) de 12,5 (TEG) e 24,6 (MP-50) em relação ao sêmen *in natura*, o que foi semelhante aos resultados obtidos para suçuaranas (Oliveira *et al.*, 2001) e para gatos domésticos (Zambelli *et al.*, 2002).

Tabela 23. Medidas descritivas para o vigor espermático de *Leopardus pardalis*, segundo a variação relativa (%) dos momentos *in natura* e pós-descongelado, nos diluentes TEG e MP-50, Botucatu, 2004.

Medida Descritiva	Diluyente		Resultado do Teste Estatístico
	TEG	MP50	
Média	-21,24	-17,30	15,00 (0,05 < p < 0,10)
Desvio Padrão	5,79	5,45	
Valor Mínimo	-25,05	-21,62	
Mediana	-23,40	-20,00	
Valor Máximo	-11,03	-9,09	

Ao se calcular o índice de motilidade progressiva (IMP) para o sêmen descongelado, observou-se que os valores encontrados, 72,5 (TEG) e 68,5 (MP-50) foram semelhantes aos obtidos para gatos domésticos congelados em diluente com 4% de glicerol, 67,8 (Nelson *et al.*, 1999). A queda de 16,6 pontos no meio TEG para o IMP foi semelhante ao obtido para sêmen de tigre siberiano descongelado (Donoghue *et al.*, 1992).

O resultado estatístico da integridade funcional da membrana plasmática pelo teste hiposmótico também mostra o mesmo impasse estatístico da motilidade e vigor espermático (Tabela 24), sendo considerado superior no diluente MP-50 (Tabela 20), apenas em um nível de confiança entre 5 e 10% (0,05 < p < 0,10), ou seja, seria necessário ampliar o número de amostras para uma resposta mais clara.

Tabela 24. Medidas descritivas para o teste hiposmótico de *Leopardus pardalis*, segundo a variação relativa (%) dos momentos in natura e pós-descongelado, nos diluentes TEG e MP-50, Botucatu, 2004.

<i>Medida Descritiva</i>	<i>Diluyente</i>		<i>Resultado do Teste Estatístico</i>
	<i>TEG</i>	<i>MP50</i>	
Média	-48,94	-27,60	15,00 (0,05<p<0,10)
Desvio Padrão	26,07	10,48	
Valor Mínimo	-93,80	-41,28	
Mediana	-42,89	-23,95	
Valor Máximo	-26,38	-16,69	

Tabela 25. Medidas descritivas para a integridade de membrana por sondas fluorescentes de *Leopardus pardalis*, segundo a porcentagem (%) obtida após o processo de criopreservação de sêmen nos diluentes TEG e MP-50, Botucatu, 2004.

<i>Medida Descritiva</i>	<i>Diluyente</i>		<i>Resultado do Teste Estatístico</i>
	<i>TEG</i>	<i>MP50</i>	
Média	47,51	40,49	9,00 (p>0,10)
Desvio Padrão	8,80	6,46	
Valor Mínimo	32,50	31,13	
Mediana	51,86	40,83	
Valor Máximo	53,83	48,83	

A análise de integridade morfofuncional da membrana plasmática por sondas fluorescentes, não apresenta diferença estatística entre os meios (Tabela 25), sendo que o TEG apresenta até uma média superior à média do diluyente MP-50 (Tabela 20). A incoerência dos resultados das análises de integridade de membrana pelo teste hiposmótico e por sondas fluorescentes leva à mesma problemática exposta para o gato-do-mato-pequeno em relação ao teste hiposmótico, cujos resultados não foram confiáveis para predizer a integridade de membrana neste experimento.

A média obtida na análise por sondas fluorescentes (43,1%) foi intermediária entre médias apresentadas em estudos que utilizaram cães (Ström *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 2002; Chirinéa *et al.*, 2003) e eqüinos (Aurich *et al.*, 1996; Neild *et al.*, 1999; Papa *et al.*, 2002).

Em relação à morfologia, os resultados encontrados para espermatozóides normais, defeitos maiores e menores não foram significativamente diferentes entre os dois diluidores utilizados (Tabelas 26, 27 e 28).

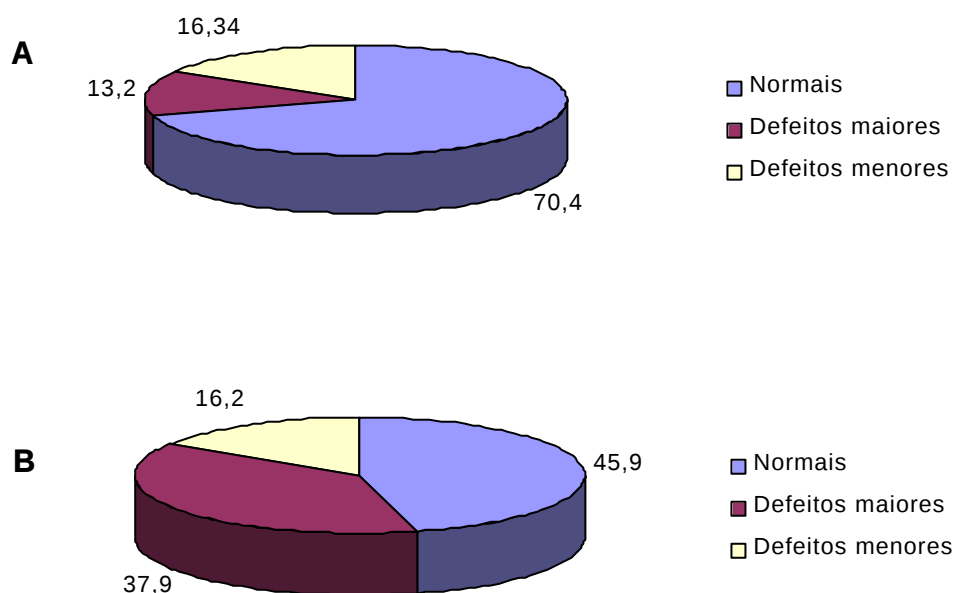


Figura 6. Representação gráfica dos resultados obtidos na análise da morfologia espermática de *Leopardus pardalis* nos momentos *in natura* (A) e após a criopreservação (B) (médias dos resultados obtidos utilizando-se os diluidores TEG e MP-50), Botucatu, 2004.

A porcentagem de espermatozóides normais sofreu uma queda de 25,5 pontos percentuais, em uma média entre os dois diluentes, após a criopreservação, o que foi reflexo do considerável aumento na porcentagem de defeitos maiores (média de 24,7 pontos percentuais) (Figura 6). A elevação na taxa de defeitos maiores foi representada pelo aumento de alterações de acrossomo (27 pontos percentuais) (Figura 7d) decorrentes do processo de congelação e descongelamento. Os valores obtidos para os defeitos menores do sêmen descongelado e do sêmen *in natura* foram semelhantes, mostrando que nesta espécie não houve aumento relativo de lesões de cauda decorrentes do processo de criopreservação. (Tabela 21).

Tabela 26. Medidas descritivas para a morfologia espermática – espermatozóides normais - de *Leopardus pardalis*, segundo a variação relativa (%) dos momentos *in natura* e pós-descongelado, nos diluentes TEG e MP-50, Botucatu, 2004.

Medida Descritiva	Diluyente		Resultado do Teste Estatístico
	TEG	MP50	
Média	-31,11	-38,95	7,00 (p > 0,10)
Desvio Padrão	10,52	16,01	
Valor Mínimo	-47,78	-57,46	
Mediana	-25,30	-37,82	
Valor Máximo	-23,03	-16,36	

Tabela 27. Medidas descritivas para a morfologia espermática – defeitos menores - de *Leopardus pardalis*, segundo a variação relativa (%) dos momentos *in natura* e pós-descongelado, nos diluentes TEG e MP-50, Botucatu, 2004.

Medida Descritiva	Diluyente		Resultado do Teste Estatístico
	TEG	MP50	
Média	-13,57	5,51	11,00 (p > 0,10)
Desvio Padrão	36,27	30,11	
Valor Mínimo	-56,70	-32,43	
Mediana	-16,22	1,03	
Valor Máximo	43,84	45,61	

Tabela 28. Medidas descritivas para a morfologia espermática – defeitos maiores - de *Leopardus pardalis*, segundo a variação relativa (%) dos momentos *in natura* e pós-descongelado, nos diluentes TEG e MP-50, Botucatu, 2004.

Medida Descritiva	Diluyente		Resultado do Teste Estatístico
	TEG	MP50	
Média	305,82	318,17	9,00 ($p > 0,10$)
Desvio Padrão	233,88	245,39	
Valor Mínimo	46,46	84,43	
Mediana	284,26	259,23	
Valor Máximo	631,41	669,75	

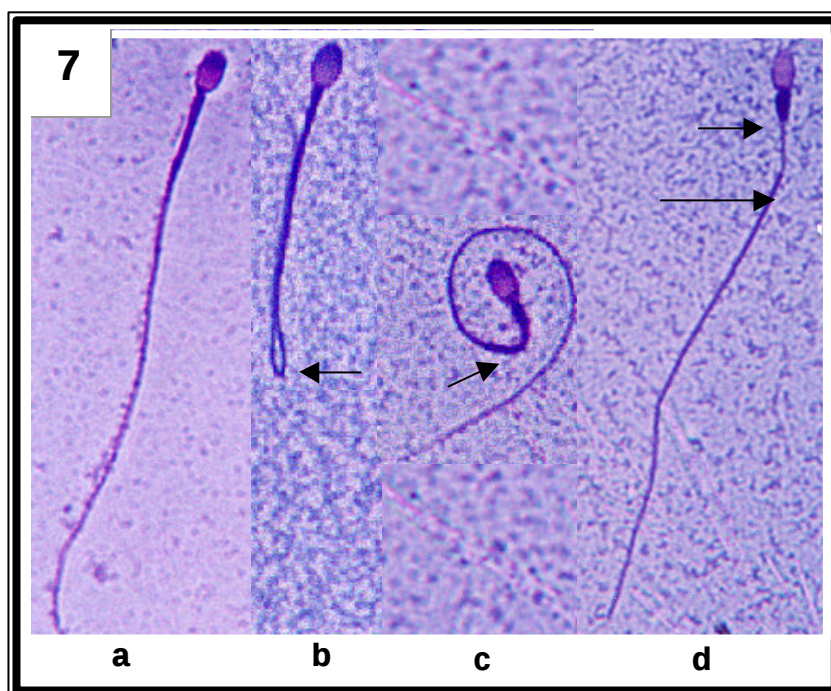


Figura 7. Morfologia espermática em sêmen *in natura* (IN) ou criopreservado (C) de *Leopardus pardalis*, utilizando-se a coloração simples de “Pope” (Pope *et al.*, 1991), em microscopia óptica, 1000x. a) Espermatozóide normal (IN). b) Espermatozóide com cauda dobrada (C). c) peça intermediária dobrada (C). d) Defeito de peça intermediária (bainha mitocondrial) e ausência de acrossomo (C), Botucatu, 2004.

Utilizando-se a média da porcentagem de defeitos acrossomais dos meios de congelação TEG e MP-50, 31%, verificou-se que o valor obtido foi bastante inferior ao relatado por Swanson *et al*, 1996a (50-60%) para o sêmen descongelado da mesma espécie, ou do guepardo e da onça-pintada (70%) (Swanson *et al.*, 1996b). Porém, convém lembrar que a contagem neste experimento foi relativa, levando-se em consideração todas as alterações espermáticas.

4. ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL

Analisando as imagens em microscopia de transmissão, observou-se que espermatozóides obtidos do sêmen *in natura*, para as duas espécies (*Leopardus pardalis* e *L. tigrinus*) apresentaram, em geral, membranas plasmática e acrossomais íntegras com conteúdo homogêneo e núcleo condensado e homogêneo (Figuras 8a e 9a).

Amostras de sêmen criopreservado nos dois diluidores (TEG e MP-50) mostraram alterações de acrossomo em diversos graus, como:

- 1) distensão da membrana plasmática e acrossomal externa com alteração do conteúdo interno (Figuras 8b¹, 8d, 9b);
- 2) fusão e vesiculação das membranas plasmática e acrossomal externa com perda do conteúdo e integridade da membrana acrossomal interna (Figuras 8b² e 9c);
- 3) fusão e vesiculação das membranas plasmática e acrossomal externa e destacamento da membrana acrossomal interna (Figura 8e).

Alterações semelhantes em membranas acrossomais já foram descritas em espermatozóides de gatos domésticos submetidos ao choque térmico durante o resfriamento de 25 a 4°C, sem adição de crioprotetor, comprovando que os danos em acrossomo são iniciados nesta etapa da congelação, principalmente quando a curva de resfriamento é rápida (>4°C/min), independente da presença do crioprotetor (Pukazhenth *et al.*, 1999).

A fusão e vesiculação da membrana plasmática e acrossomal externa é um fenômeno importante que ocorre durante a reação acrossômica verdadeira, liberando as enzimas acrossomais que possibilitarão a penetração do espermatozóide no oócito (Müller, 2000). Se este fenômeno ocorre de maneira precoce e desorganizada, em resposta à criopreservação, inviabilizará o espermatozóide para utilização em biotécnicas reprodutivas, como inseminação artificial ou fertilização *in vitro*.

Os espermatozóides observados em microscopia eletrônica após a descongelação apresentavam, com pouquíssimas exceções, alterações severas de acrossomo. A análise da morfologia em microscopia óptica (coloração simples de “Pope”), mostrou apenas 17% e 31% dos espermatozóides (tigrina e jaguatirica, respectivamente) com alterações de acrossomo. Estes dados levam a crer que a coloração simples de “Pope” é bastante eficiente para apontar a presença ou ausência de acrossomo, mas não é tão eficiente para detectar alterações que antecedem a perda do acrossomo durante a reação acrossômica.

Durante a análise foi observado um espermatozóide de *Leopardus tigrinus* no momento *in natura* com um defeito de acrossomo semelhante ao “knobbed” (Barth e Oko, 1989) (Figura 8c). O “knobbed” é uma alteração de acrossomo que deriva de um distúrbio na espermatogênese, raramente observado em altas proporções, e geralmente associado a outros defeitos espermáticos ligados à espermatogênese (Barth e Oko, 1989). Long *et al.*, 1996, encontraram malformações de acrossomo similares em sêmen de gatos domésticos teratospérmicos (26% de incidência) e normospérmicos (1,1%) durante a análise ultraestrutural de espermatozóides. Acredita-se que, no presente estudo, este seja um achado isolado, já que não foi significativo nas contagens de morfologia em microscopia óptica.

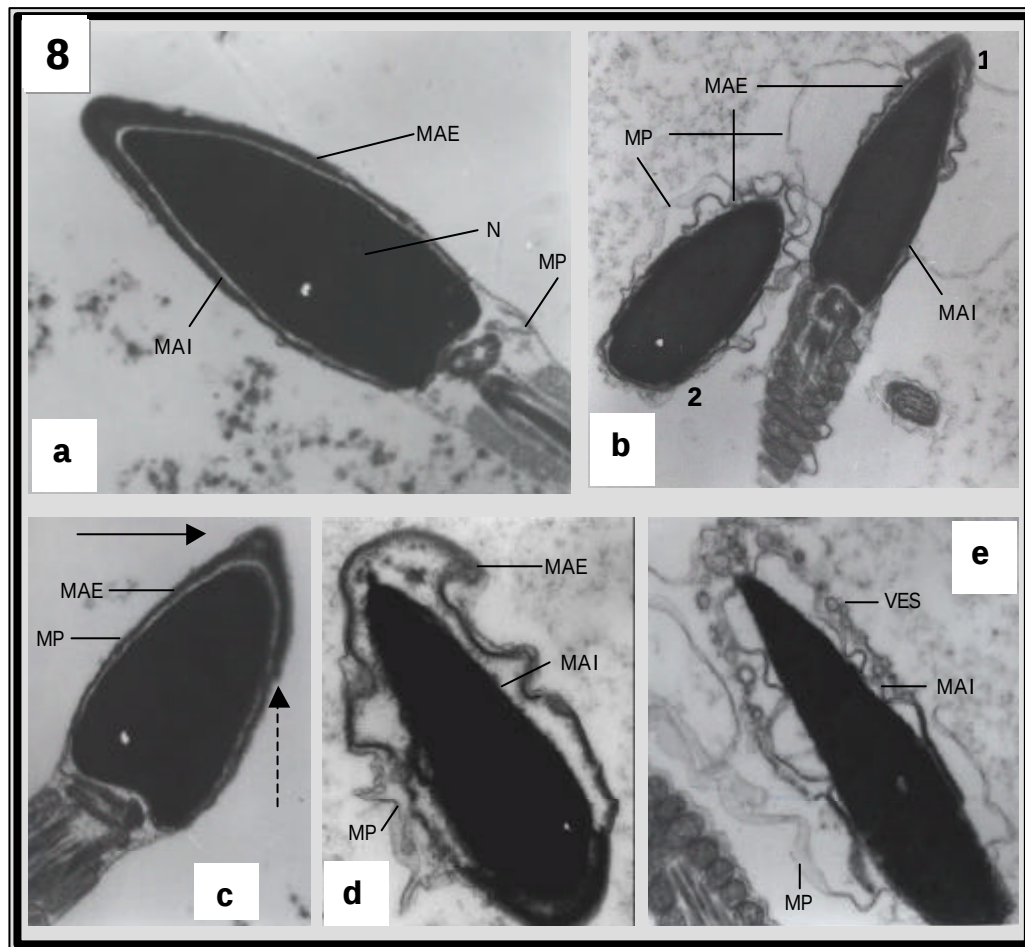


Figura 8. Ultraestrutura espermática de *Leopardus tigrinus* nos momentos *in natura* (IN) e após a criopreservação (C). a) Espermatozóide com integridade acrossomal e homogeneidade de núcleo (N) (IN) (31500x). b¹) Espermatozóide mostrando distensão de membrana plasmática (MP) e acrossomal externa (MAE), porém com integridade de acrossomo; b²). Vesiculação (VES) das membranas plasmática e acrossomal externa (C) (21200x). c) Defeito de acrossomo “knobbed” (flexa cheia) e irregularidade de acrossomo (flexa tracejada) (IN) (41200x). d) Distensão de membrana acrossomal externa e heterogeneidade de conteúdo, sem perda da integridade acrossomal (C) (57500x). e) Vesiculação da membrana acrossomal externa e destacamento da membrana acrossomal interna (MAI) (C) (41200x), Botucatu, 2004.

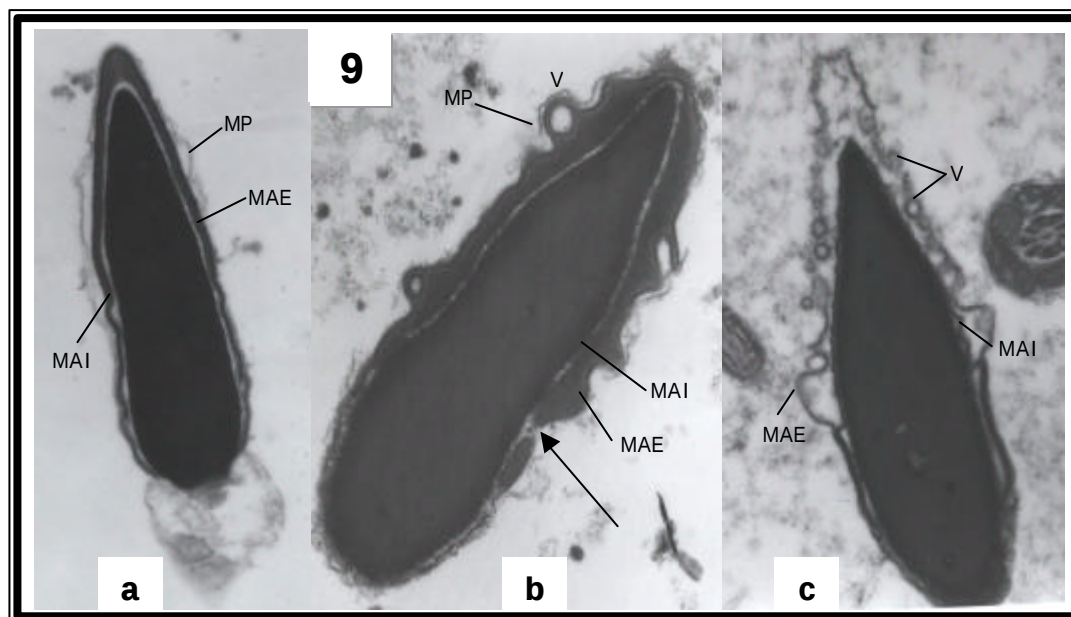


Figura 9. Ultraestrutura espermática de *Leopardus pardalis*, nos momentos *in natura* (IN) e criopreservado (C). a) Espermatozói­de com integridade de membrana plasmática e de acrossomo (IN) (23000x). b) Início de vesiculação acrossômica (V), membrana plasmática (MP) fragmentada, descontinuidade de acrossomo (flexa) (C) (42000x). c) Fusão e vesiculação de membrana plasmática e acrossomal externa (MAE), membrana acrossomal interna (MAI) aderida à membrana nuclear (C) (31500x), Botucatu, 2004.

5. DISCUSSÃO GERAL

A célula espermática de cada espécie responde de maneira particular quando submetida aos vários fatores estressantes durante o processo de criopreservação, como alterações de osmolaridade, de temperatura, formação de cristais de gelo e toxicidade do crioprotetor, o que acarreta em danos irreversíveis às membranas plasmáticas e acrossomais, em diferentes graus. Além disto, as espécies também apresentam padrões específicos para características reprodutivas e seminais, fazendo com que uma espécie apresente melhor qualidade seminal que outra, refletindo nos resultados pós-criopreservação.

Neste estudo, o gato-do-mato-pequeno foi a espécie que apresentou maior porcentagem de espermatozóides pleiomórficos no momento *in natura*, o que provavelmente conferiu ao espermatozóide menor resistência aos fatores estressantes da congelação/descongelação. Pukazhenthil *et al.* (1999), estudando a resposta do sêmen de gatos normospermicos e teratospermicos submetidos ao resfriamento, perceberam que os espermatozóides de gatos com alto grau de pleiomorfismo, mesmo quando selecionados pela técnica de *swim up*, apresentavam menor resistência ao estresse térmico. Long *et al.* (1996), relataram que até mesmo os espermatozóides considerados normais de espécimes teratospermicos têm disfunções que impedem a interação normal ovócito-espermatozóide.

Donoghue *et al.* (1992) verificaram que o sêmen de tigres possuía baixo índice de pleiomorfismo (8 a 22% de espermatozóides defeituosos) e um alto índice de motilidade progressiva (87 a 95%), *in natura*. Após a congelação, os autores não constataram uma diminuição na porcentagem de espermatozóides normais, e uma queda reduzida no índice de motilidade progressiva, de 7 a 25 pontos. O sêmen descongelado do tigre foi capaz de fertilizar *in vitro* ovócitos de tigresa e de penetrar a zona pelúcida de ovócitos de gata doméstica em igual proporção ao sêmen *in natura*.

No presente estudo, embora não se tenha utilizado bioensaios para prever a capacidade de fertilização do sêmen criopreservado ou *in natura* da jaguatirica, obtivemos valores semelhantes para índice de motilidade progressiva, com queda média de 13 pontos após a descongelação. Donoghue *et al.* (1992) não obtiveram alterações na morfologia espermática após a criopreservação, porém não utilizaram nenhuma coloração especial para acrossomos. Para as jaguatiricas, a queda na porcentagem de defeitos espermáticos (25,5 pontos percentuais) ocorre em função das lesões acrossômicas (24,7 pontos percentuais). Estes dados reforçam a hipótese de que espécies com menor grau de pleiomorfismo respondem melhor ao processo de criopreservação.

Donoghue *et al.* (1992), ainda no mesmo estudo, discutem a superioridade do criodiluyente (PDV + 4% glicerol) e da técnica de congelamento (*pellets*) utilizada sobre o diluyente (TesT + 7,5% glicerol) e a técnica (palhetas) que foram utilizados por Byers *et al.* (1989) para congelar sêmen de tigre, uma vez que o primeiro estudo obteve melhores resultados nas avaliações espermáticas após a criopreservação que o segundo.

Hay e Goodrowe (1993), compararam a eficiência de três meios que continham 20% gema de ovo e 3% de glicerol: o PDV, o TRIS-glicose e o TRIS-frutose, para congelar sêmen de gato doméstico em palhetas francesas. Encontraram superioridade nos meios que continham TRIS, em relação ao meio PDV. É possível que a resposta satisfatória encontrada por Donoghue *et al.* (1992) após a congelamento do sêmen de tigres esteja mais relacionada com a técnica (*pellets*) associada à baixa concentração de glicerol (4%) utilizada, do que à composição do meio PDV, que é um diluyente de composição simples (açúcar, gema de ovo e glicerol).

Para congelar o sêmen do gato-do-mato-pequeno e da jaguatirica, optou-se por diluentes que possuíam tampões; porém, a concentração de crioprotetor (7% glicerol no meio TEG e 3% glicerol + 2% dimetilformamida no meio MP-50)) esteve acima da sugerida para felinos - 4% (Nelson *et al.*, 1999). Optou-se também por utilizar o envasamento em palhetas. Para esta técnica de armazenamento, tornou-se necessário diluir o sêmen em meio glicerolizado antes do período de equilíbrio. Foi adotado um período de equilíbrio de uma hora em refrigerador de sêmen, trinta minutos mais longo que o utilizado por Donoghue *et al.* (1992) para tigres, por Swanson *et al.* (1996a) para jaguatiricas e por Swanson *et al.* (1996b) para guepardos e onças-pintadas. Este período foi necessário para que a taxa de resfriamento fosse inferior a 0,5°C/min (Pukazhenth, 1999). Porém, na tentativa de minimizar os danos acrossomais decorrentes do estresse provocado pelo resfriamento, o sêmen foi exposto a

altas concentrações de crioprotetor (7 e 5%) em temperatura acima de 5°C por um tempo prolongado (1h), o que também pode ter causado danos às células espermáticas.

A concentração de crioprotetores no meio MP-50 foi inferior à concentração utilizada no meio TEG. Apesar disto, não houve diferença estatística entre os resultados das análises do sêmen congelado nos dois diluentes. É possível que adequações em pH, osmolaridade e concentração de crioprotetores intracelulares possam aumentar a eficiência do diluente MP-50, já que este foi desenvolvido para equinos (Papa *et al.*, 2002).

Neste estudo, embora a jaguatirica tenha apresentado melhor motilidade e vigor espermáticos que o gato-do-mato-pequeno após a criopreservação (Tabelas 10 e 20), as imagens obtidas em microscopia de transmissão não diferiram entre as espécies, demonstrando que o processo de congelação e descongelação sempre resulta em danos severos ao acrossomo, a despeito do diluente utilizado. Seria interessante verificar se porcentagens menores de crioprotetor minimizariam estes danos e também se estes níveis de lesões já estão presentes após o período de equilíbrio, antes da congelação. Seria também interessante provar a capacidade de fertilização do sêmen criopreservado das duas espécies utilizando-se de bioensaios, com a finalidade de confirmar o comprometimento da viabilidade destas células frente à fertilização.

Experimento I I

Sêmen do epidídimo *versus* sêmen eletroejaculado:
efeitos da criopreservação sobre a célula espermática
no gato doméstico (*Felis catus*).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- ❖ Comparar a eficiência do sêmen de gato doméstico colhido por duas técnicas, a eletroejaculação e pós-orquiectomia (cauda do epidídimo e ducto deferente), utilizando-se da quantificação dos danos causados pela criopreservação;
- ❖ relatar as alterações ultraestruturais do espermatozóide do gato doméstico após o processo de congelação/descongelação.

MATERIAL E MÉTODO

LOCAL DO EXPERIMENTO

As colheitas e o processamento do material foram realizados nas dependências do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da UNESP/Botucatu. Todas as análises foram realizadas nos laboratórios do mesmo Departamento, exceto o processamento do material e a obtenção das imagens para as análises ultraestruturais, efetuados no Setor de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências (IB) da UNESP/Botucatu.

1. ANIMAIS

Foram estudados 10 gatos domésticos de proprietários particulares, machos, sem raça definida, entre dois e seis anos de idade e pesando entre 4,1 e 5,0 kg. Todos tinham acesso à luz natural e se alimentavam com rações comerciais de marcas variadas. Não foi exigida restrição sexual antes da colheita do sêmen.

2. CONTENÇÃO FARMACOLÓGICA

Foram utilizados dois protocolos anestésicos para colheitas de sêmen:

- 1) Cloridrato de tiletamina e zolazepam (Zoletil® 50) 13 mg/kg, tartarato de butorfanol (Torbugesic® 1%) 0,3 mg/kg, acepromazina (Acepran® 0,2%) 0,1 mg/kg;
- 2) Cloridrato de tiletamina e zolazepam 15 mg/kg, morfina (Dimorf® 1%) 0,3 mg/kg.

Quando necessário, complementava-se a anestesia com 0,2 mg/kg de Zoletil® 50, via intravenosa. Foram monitorados a frequência cardíaca e respiratória, a pressão arterial, a temperatura corporal e o plano anestésico durante a intervenção.

4. EXAME ANDROLÓGICO

Avaliação da genitália externa

Os testículos foram palpados para definição da consistência e mensurados para a determinação do volume testicular. O pênis foi exposto para verificação do aspecto, presença de espículas e secreções no prepúcio.

Colheita de sêmen

Colheu-se o sêmen de cada um dos 10 gatos domésticos com auxílio de um eletroejaculador (Eletrovét®, São Paulo, Br), descrito no Experimento I e transdutor (1 cm de diâmetro e 13

cm de comprimento) contendo três eletrodos de cobre no terço proximal. O protocolo de eletroejaculação utilizado foi baseado em Howard (1990), porém, utilizou-se da inclusão de estímulos e variação na voltagem de acordo com a resposta do animal. Com a finalidade de evitar perdas do já escasso volume ejaculado, que freqüentemente ficava aderido à mucosa peniana e ao prepúcio, um cateter intravenoso (nº 22) foi introduzido na uretra peniana (Verstegen, 2003¹). Desta forma, o conteúdo ejaculado era direcionado ao canhão do cateter, recolhido com auxílio de micropipeta e depositado em frasco plástico. A cada série de estímulos, o frasco coletor era substituído, ou quando havia indícios de contaminação por urina. Os frascos foram mantidos em suporte de isopor (suporte para tubos de colheita de sangue), em temperatura ambiente. Após o procedimento, os volumes contidos nos frascos foram agregados em um só frasco plástico com capacidade para 1,5 mL.

Ao término da eletroejaculação, procedeu-se à orquiectomia bilateral dos animais. Os testículos foram imediatamente manipulados para colheita de sêmen por compressão da cauda do epidídimo e ducto deferente. A amostra obtida foi diluída em 300 µL de solução fisiológica a 0,9% (308 mOsm/kg) em temperatura ambiente e depositada em frasco plástico com capacidade para 1,5 mL.

Avaliações do sêmen

O sêmen proveniente das duas técnicas de colheita foi avaliado para motilidade, vigor, concentração e morfologia espermática em microscopia óptica (coloração simples de “Pope”)

¹ Verstegen, J., 2003. Comunicação pessoal.

e de transmissão, e integridade de membrana (sondas fluorescentes). As avaliações de aspecto, pH e volume do sêmen foram efetuadas somente no ejaculado.

No momento após a descongelação, o sêmen foi novamente avaliado para motilidade, vigor e morfologia espermática em microscopia óptica e de transmissão e integridade de membrana por sondas fluorescentes. Todas as técnicas utilizadas estão descritas no item Material e Método do *Experimento I*.

5. CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN

O mesmo protocolo de congelação foi utilizado para o sêmen proveniente das duas técnicas de colheita. Após a retirada das alíquotas destinadas às análises iniciais, o sêmen foi centrifugado a 300g por 10 minutos. O sobrenadante foi removido. Ao *pellet* de células foi adicionado o meio TEG (*Experimento I*), mantido em temperatura ambiente e em volume suficiente para que cada palheta (0,25 mL) contivesse aproximadamente 5 milhões de espermatozóides móveis, utilizando-se a fórmula:

$$\text{Volume do diluente (mL)} = \frac{N}{(20 \times 10^6)}$$

Onde N é o número total de espermatozóides móveis (concentração x volume) e 20×10^6 representa o número de espermatozóides que se deseja obter em 1mL de diluente, para que cada palheta de 0,25 mL contenha 5 milhões de espermatozóides móveis. As técnicas de equilíbrio e congelação, o armazenamento e a técnica de descongelação seguiram a mesma metodologia descrita no *Experimento I*.

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a comparação entre as técnicas de colheita de sêmen, considerando a variação da resposta em relação aos respectivos momentos *in natura* (avaliada em porcentagem, ou seja, a variação relativa), utilizou-se o teste não paramétrico de Wilcoxon (Norman e Streiner, 1994).

A apresentação dos resultados foi realizada considerando as medidas descritivas de posição e variabilidade, seguidas do respectivo teste estatístico. O sinal negativo da medida descritiva indicou um decréscimo da variação (queda do valor do sêmen congelado em relação ao *in natura*), enquanto o positivo, um acréscimo (elevação do valor do sêmen congelado em relação ao *in natura*).

O nível de confiança adotado para a significância entre os dados foi de 5% ($p < 0,05$).

As análises das imagens obtidas em microscopia de transmissão foram estritamente descritivas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram utilizados dois protocolos anestésicos, sendo que o primeiro (Zoletil®, Torbugesic® e Acepran®) foi considerado inadequado após a segunda colheita, devido à contaminação do sêmen por urina, durante a eletroejaculação. O segundo protocolo (Zoletil®, Dimorf®) foi considerado satisfatório às colheitas, pois proporcionou tranquilidade ao animal, não apresentando vocalização ou qualquer manifestação de desconforto, proporcionou segurança para a equipe técnica e não houve episódios de contaminação por urina em nenhuma das séries de estímulos realizadas.

Em literatura, a contaminação do sêmen do gato doméstico por urina não é freqüentemente relatada e está associada à aplicação de estímulos elétricos com voltagens superiores (8V) (Pineda e Dooley, 1984) às utilizadas neste experimento (2 a 5V). Até mesmo em estudos que utilizaram a associação cloridrato de tiletamina / butorfanol / medetomidina não houve relatos de contaminação (Pukazhenthil *et al.*, 2002). No Experimento I utilizamos protocolos anestésicos nos quais o butorfanol foi um dos fármacos integrantes, e obtivemos elevada contaminação por urina. Neste experimento utilizamos um dos protocolos associado ao butorfanol, e as duas colheitas realizadas com este protocolo foram contaminadas. Porém, no

experimento anterior o protocolo anestésico foi associado ao isoflurano e, no atual, à acepromazina, aumentando o número de variáveis e impossibilitando qualquer conclusão.

A média do volume testicular total corrigido para o peso corporal para o gato doméstico foi de 0,78 cm³/kg (tabela 29), valor intermediário entre os felinos do gênero *Leopardus* (Morais *et al.*, 2002) e os grandes felinos selvagens (Barone *et al.*, 1994, Swanson *et al.*, 1995).



Figura 10. Ilustração do formato cônico da glânde do pênis do gato (*Felis catus*), diferindo do formato da glânde e do gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*) e da jaguatirica (*Leopardus pardalis*), Botucatu, 2004.

A cor do ejaculado variou de translúcida à esbranquiçada, dependendo da concentração do sêmen. O amarelado esteve associado à contaminação por urina (duas frações, em duas colheitas), assim como o avermelhado esteve associado à contaminação por sangue (uma fração).

Tabela 29. Idade (ID), peso corporal (PC), volume testicular total (VTT) e corrigido para o peso corporal (VTT/PC) de gato doméstico (*Felis catus*, n = 10), e média final para os valores obtidos, Botucatu, 2004.

gato	ID (anos)	PC (kg)	VTT (cm³)	VTT/PC (cm³.kg⁻¹)
1	4	4,9	3,58	0,73
2	3	4,6	2,67	0,58
3	3	4,1	3,43	0,84
4	4	4,5	2,28	0,51
5	6	4,4	3,95	0,90
6	3	4,3	3,54	0,82
7	3	4,5	3,48	0,77
8	4	4,2	3,61	0,86
9	4	4,5	5,07	1,13
10	2	5,0	3,60	0,72
médias		4,5 ± 0,3	3,52 ± 0,7	0,78 ± 0,1

O volume de sêmen obtido pela eletroejaculação, em média 0,14 mL (Tabela 30), está de acordo com os valores médios descritos para o gato doméstico (0,076 a 0,22 mL), porém a concentração está abaixo da média (111,27 x 10⁶ contra 168 a 361 x 10⁶ spz/mL) (Axnèr e Linde-Fosberg, 2002). Os trabalhos que apresentam dados em eletroejaculação utilizando felinos domésticos não apresentam médias de peso corporal, ou médias de volume testicular. É possível que diferenças no protocolo e no equipamento de eletroejaculação possam ter causado esta variação. Pineda e Dooley (1984), estudando a intensidade do estímulo e a seqüência na aplicação de voltagens em protocolos para eletroejaculação, verificaram que gatos domésticos ejaculavam um número maior de espermatozóides em voltagens mais altas (4 a 8V). O protocolo utilizado neste experimento não ultrapassou o limite dos 5V propostos por Howard *et al.* (1990), a fim de evitar a contaminação por urina. Pukazhenthil *et al.*, 2002, utilizaram um protocolo duplicado, onde aplicaram 80 estímulos de 2 a 6 volts, repetindo após

30 minutos e obtiveram em média $23,4 \times 10^6$ espermatozóides por ejaculado, enquanto no presente experimento obteve-se $15,5 \times 10^6$ espermatozóides (Tabela 30).

Tabela 30. Médias obtidas para as características do sêmen proveniente de eletroejaculação e subsequente colheita do epidídimo em gato doméstico (*Felis catus*, n = 10), Botucatu, 2004.

	EJACULADO	EPIDÍDIMO
Volume (mL)	$0,14 \pm 0,1$	0,30
pH	$8,40 \pm 0,2$	-
Concentração (sptz/mL)	$111,27 \pm 75,3$	$44,10 \pm 54,9$
Motilidade espermática (%)	$82,00 \pm 6,7$	$77,50 \pm 8,2$
Vigor espermático (0 a 5)	$4,80 \pm 1,3$	$4,50 \pm 0,7$
Índice de motilidade progressiva (0 a 100)	89	83,7
Morfolologicamente normais (%)	$53,4 \pm 16,7$	$23,10 \pm 13,9$
Número de sptz móveis ($\times 10^6$)	15,57	13,23
Integridade de membrana (sondas fluorescentes) (%)	$72,80 \pm 9,7$	$71,70 \pm 18,8$

O pH mensurado nos ejaculados foi sempre alcalino, variando entre 8,1 a 8,7 (média de 8,4) (Tabela 30). A literatura relata valores para pH entre 6,6 a 8,8 (Axnèr e Linde-Fosberg, 2002), porém, sabe-se que o pH do sêmen obtido por eletroejaculação é mais alcalino (Platz e Seager, 1978; Johnston *et al.*, 1988), devido à estimulação direta da próstata. Verificou-se que até mesmo as amostras contaminadas por urina não apresentaram queda brusca do pH (8,1). Em um dos animais, colheu-se urina antes e após a eletroejaculação por cistocentese. Na urina colhida no momento pré-eletroejaculação, a presença de espermatozóides foi subjetivamente avaliada em + (uma cruz) e o pH mensurado foi de 7,4. Após a colheita de sêmen, a urina apresentava ++++ (quatro cruzeiros) para presença de espermatozóides, confirmando a ocorrência de ejaculação retrógrada. O pH ideal para a urina do gato doméstico, em literatura, se mantém ao redor de 6,5, e alterações para mais ou para menos podem indicar presença de

cálculos de diferentes constituições (Osborne e Finco, 1995). O registro do pH alcalino na urina do gato doméstico teve como objetivo ilustrar que a contaminação por urina pode, dependendo do grau, trazer mudanças discretas no pH do sêmen. Outras variáveis, como concentração de espermatozóides, ou quantidade de fluido prostático, por exemplo, podem influenciar nas variações de pH.

A motilidade espermática média do sêmen proveniente do epidídimo foi similar à motilidade apresentada pelo sêmen ejaculado (77,5% e 82,0%, respectivamente, $p > 0,05$). Axnèr *et al.*, 1999, verificaram que o espermatozóide ganha motilidade durante o trânsito pelo corpo epididimário, ao mesmo tempo em que a gota citoplasmática proximal é deslocada em sentido distal. Neste experimento, a diluição do sêmen em solução fisiológica anterior à centrifugação causou uma diminuição da motilidade espermática, que só foi restituída após a diluição do *pellet* em TEG. Portanto, a motilidade espermática do sêmen epididimário foi avaliada imediatamente após a centrifugação e diluição no criodiluyente.

A porcentagem média de espermatozóides normais no ejaculado foi de 53,4 (Tabela 30), porém compreendeu valores entre 26 e 75%. Três dos gatos estudados apresentaram menos de 40% de espermatozóides normais no ejaculado, que é indicativo de teratospermia (Wood *et al.*, 1993). Embora neste estudo a porcentagem de espermatozóides pleiomórficos tenha sido média (eletroejaculação) a alta (epidídimo), a motilidade espermática e o índice de motilidade espermática foram considerados muito bons no primeiro momento (82 e 89% para ejaculado e 77,5 e 83,7% para sêmen do epidídimo). Outros estudos mostram que a teratospermia não está vinculada à porcentagem de espermatozóides móveis no sêmen *in natura* (Wood *et al.*, 1993; Pukazhenthì *et al.*, 2000). Pukazhenthì *et al.* (2001) relataram que felinos teratospérmicos

apresentam quatro tipos de defeitos com maior frequência: peça intermediária dobrada, cauda dobrada, cauda fortemente enrolada e defeitos de acrossomo.

Tabela 31. Valores médios ($\pm$ DP) para a morfologia espermática em gato doméstico (*Felis catus*, n = 10), utilizando-se duas técnicas de colheita de sêmen, a eletroejaculação e colheita do epidídimo, em dois momentos, *in natura* e após a criopreservação, Botucatu, 2004.

	<i>In natura</i>		<i>Pós-criopreservação</i>	
	<i>Eletroejaculação</i>	<i>Epidídimo</i>	<i>Eletroejaculação</i>	<i>Epidídimo</i>
Espermatozóides normais (%)	53,4 $\pm$ 16,6	23,1 $\pm$ 13,9	37,4 $\pm$ 8,8	31,7 $\pm$ 12,8
Defeitos maiores (%)	14,9 $\pm$ 7,1	16,3 $\pm$ 11,1	35,6 $\pm$ 10,5	32,0 $\pm$ 11,4
Cabeça piriforme (%)	0	0	0,1 $\pm$ 0,3	0
Contorno anormal de cabeça (%)	0,8 $\pm$ 2,2	0,9 $\pm$ 2,5	0,5 $\pm$ 1,2	0,3 $\pm$ 0,6
Cabeça solta anormal (%)	0,1 $\pm$ 0,3	0,1 $\pm$ 0,3	0,0 $\pm$ 0,0	0,10 $\pm$ 0,3
Microcefalia (%)	0,0 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,6	0,1 $\pm$ 0,3	0,1 $\pm$ 0,3
Formas duplas (%)	0,0 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,3	0,1 $\pm$ 0,3	0,4 $\pm$ 0,7
Defeitos de acrossomo (%)	5,4 $\pm$ 2,9	7,4 $\pm$ 8,9	28,3 $\pm$ 10,2	23,5 $\pm$ 11,6
Defeitos de peça intermediária (%)	2,9 $\pm$ 1,8	1,6 $\pm$ 1,3	1,4 $\pm$ 1,6	1,6 $\pm$ 0,9
Cauda dobrada com gota (%)	0,7 $\pm$ 1,9	0,6 $\pm$ 1,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,4 $\pm$ 0,9
Cauda fortemente dobrada (%)	0,3 $\pm$ 0,6	0,6 $\pm$ 1,6	0,5 $\pm$ 0,7	1,0 $\pm$ 1,25
Cauda fortemente enrolada (%)	2,0 $\pm$ 2,2	1,2 $\pm$ 1,5	2,5 $\pm$ 2,2	1,8 $\pm$ 2,4
Fratura de cauda (%)	0,1 $\pm$ 0,3	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
Gota citoplasmática proximal (%)	2,6 $\pm$ 2,0	3,6 $\pm$ 2,9	2,1 $\pm$ 2,5	2,8 $\pm$ 2,4
Defeitos menores (%)	31,7 $\pm$ 18,6	60,6 $\pm$ 17,0	27,0 $\pm$ 14,6	36,3 $\pm$ 13,9
Cabeça solta normal (%)	0,6 $\pm$ 1,0	0,4 $\pm$ 0,9	0,4 $\pm$ 0,8	0,0 $\pm$ 0,0
Defeitos de inserção de cauda (%)	0,2 $\pm$ 0,8	0,06 $\pm$ 0,5	0,2 $\pm$ 0,5	0,15 $\pm$ 0,3
Cauda enrolada (%)	6,3 $\pm$ 5,5	10,6 $\pm$ 9,0	9,5 $\pm$ 5,6	11,6 $\pm$ 14,6
Cauda dobrada (%)	17,6 $\pm$ 19,5	20,2 $\pm$ 13,0	13,9 $\pm$ 12,7	14,0 $\pm$ 10,6
Gota citoplasmática distal (%)	6,5 $\pm$ 5,2	29,2 $\pm$ 15,4	2,8 $\pm$ 1,8	10,4 $\pm$ 8,6

A maior parte dos defeitos no ejaculado dos gatos deste experimento concentrou-se em defeitos de flagelo, como a cauda enrolada e dobrada (23,9%) (Tabela 31), que embora sejam

defeitos freqüentes em gatos teratospérmicos, são considerados defeitos menos relevantes à fertilidade (Barth e Oko, 1989). Estes defeitos de flagelo estão freqüentemente ligados a choque térmico, osmótico, ou consequência de manipulação inadequada do sêmen, e não à espermatogênese (Barth e Oko, 1989). Nos dois gatos que tiveram contaminação de sêmen por urina, estes valores extrapolaram para 51 e 63%, nos demais gatos os valores se limitaram a 4 e 25%, mostrando que a ocorrência da urina no ejaculado realmente resultou em alterações de cauda, tendo como uma das possíveis causas, o choque osmótico.

Axnér *et al.* (1998) estudaram as diferenças morfológicas entre espermatozóides obtidos por eletroejaculação e da cauda do epidídimo, antes que este fosse diluído. O ejaculado apresentou uma porcentagem maior de espermatozóides com caudas dobradas e enroladas (9,5%) que o epidídimo (1,0%). Os autores sugeriram que a influência osmótica do fluido seminal durante a ejaculação pudesse ter causado estes defeitos.

No presente estudo, o sêmen proveniente de colheita do epidídimo e ducto deferente apresentou uma porcentagem alta de espermatozóides com cauda dobrada e enrolada (30,8%), além de gota citoplasmática distal (29,2%) (Figura 12c) (Tabela 31). A gota citoplasmática distal é um defeito comum em espermatozóides colhidos da cauda do epidídimo e grande parte dos espermatozóides normalmente perde este resquício citoplasmático durante a ejaculação, num processo de maturação (Rao *et al.*, 1980). É possível que a alta incidência de caudas dobradas e enroladas obtidas sejam consequência da utilização de solução fisiológica como primeiro diluente do sêmen, visto que as alíquotas destinadas ao exame morfológico foram retiradas após esta diluição.

Assim como para o gato-do-mato-pequeno e jaguatirica, coincidentemente também para o gato doméstico, a incidência de defeitos de flagelo (caudas dobradas e enroladas) (Figura 12b) foi a alteração morfológica mais comum no sêmen *in natura*, independente da técnica de colheita. Apesar de todas as variáveis possíveis, suspeita-se que durante as diluições do sêmen em solução de citrato de sódio (2,9%) e depois no corante de “Pope”, o sêmen possa ter sofrido choque osmótico, o que causou alterações de flagelo. Para esclarecer esta questão, seria necessário comparar espermogramas do mesmo ejaculado realizados em câmara úmida (fixação do espermatozóiide em glutaraldeído, por exemplo) e corados pela técnica de “Pope”.

Apesar dos gatos domésticos terem apresentado uma proporção de defeitos espermáticos razoável (46,6%, no ejaculado) à alta (76,9%, no epidídimo), a maior parte dos defeitos foi classificada como defeitos menores (31,7% e 60,6%, respectivamente) (Figura 11), os quais não afetam sobremaneira a fertilidade dos animais (Axnèr *et al.*, 1999).

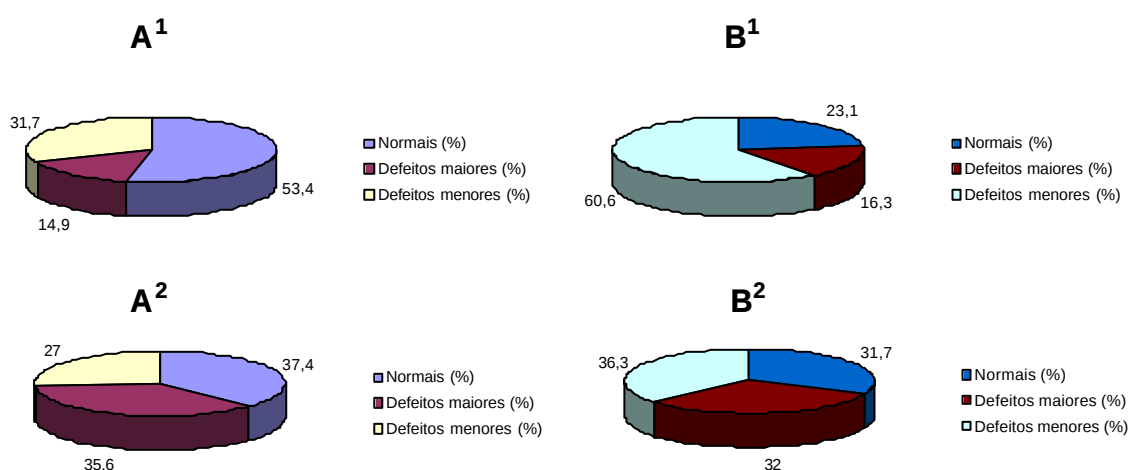


Figura 11. Representação gráfica dos dados em morfologia espermática do sêmen do gato doméstico (*Felis catus*, n = 10) obtido por meio de duas técnicas de colheita, eletroejaculação (A) e do epidídimo (B), nos momentos *in natura* (1) e pós-descongelção (2), Botucatu, 2004.

Tabela 32 Médias para características do sêmen colhido por eletroejaculação e da cauda do epidídimo no gato doméstico (*Felis catus*, n = 10) e criopreservado sob a mesma metodologia, Botucatu, 2004.

	<i>EJACULADO</i>	<i>EPIDÍDIMO</i>
Motilidade espermática (%)	62,5 ± 19,2	59,0 ± 19,1
Vigor espermático (0 a 5)	3,5 ± 0,9	3,4 ± 0,7
Espermatozóides morfolologicamente normais (%)	37,4 ± 8,8	31,7 ± 12,8
Integridade de membrana (sondas fluorescentes)	50,8 ± 9,0	53,0 ± 14,7

Os valores obtidos após a descongelação para motilidade espermática, vigor espermático, integridade de membrana e defeitos espermáticos maiores não divergiram estatisticamente para as duas técnicas de colheita utilizadas ($p > 0,05$) (Tabelas 33, 34, 35 e 38), e quando foi considerado interessante para a discussão, pôde-se uni-las para ilustrar as diferenças entre os momentos.

Tabela 33. Medidas descritivas para a motilidade espermática do sêmen do gato doméstico (*Felis catus*) colhido por eletroejaculação e do epidídimo, segundo a variação relativa (%) dos momentos pós-criopreservação e *in natura*, Botucatu, 2004.

<i>Medida Descritiva</i>	<i>Técnica</i>		<i>Resultado do Teste Estatístico</i>
	<i>Eletroejaculação</i>	<i>Epidídimo</i>	
Média	-24,63	-24,28	27,00 ($p > 0,05$)
Desvio Padrão	22,32	23,11	
Valor Mínimo	-85,71	62,50	
Mediana	-20,59	-19,64	
Valor Máximo	-7,14	0,00	

Tabela 34. Medidas descritivas para o vigor espermático do sêmen do gato doméstico (*Felis catus*) colhido por eletroejaculação e do epidídimo, segundo a variação relativa (%) dos momentos pós-criopreservação e *in natura*, Botucatu, 2004.

<i>Medida Descritiva</i>	<i>Técnica</i>		<i>Resultado do Teste Estatístico</i>
	<i>Eletroejaculação</i>	<i>Epidídimo</i>	
Média	-22,92	21,17	13,5 (p > 0,05)
Desvio Padrão	19,58	23,70	
Valor Mínimo	-66,67	-50,00	
Mediana	-20,00	-22,50	
Valor Máximo	0,00	33,33	

Tabela 35. Medidas descritivas para integridade de membrana do sêmen do gato doméstico (*Felis catus*) colhido por eletroejaculação e do epidídimo, segundo a variação relativa (%) dos momentos pós-criopreservação e *in natura*, Botucatu, 2004.

<i>Medida Descritiva</i>	<i>Técnica</i>		<i>Resultado do Teste Estatístico</i>
	<i>Eletroejaculação</i>	<i>Epidídimo</i>	
Média	-29,27	-20,93	20,00 (p > 0,05)
Desvio Padrão	14,48	28,22	
Valor Mínimo	-50,58	-70,59	
Mediana	-29,60	-21,57	
Valor Máximo	-0,83	36,07	

A motilidade espermática do sêmen descongelado nos dois grupos estudados – ejaculado e epidídimo (média 60,75%) foi superior ao obtido por Tsutsui *et al.*, 2003 (média 24%), o qual congelou sêmen da cauda do epidídimo em diluente semelhante (TRIS, OEP, frutose e 7% de glicerol). Zambelli *et al.* (2002) utilizando-se do meio TRIS-Gema (4% glicerol), resfriaram sêmen de gato proveniente de eletroejaculação até 5°C numa taxa de 12°C/min e, após 25 minutos, testaram cinco diferentes taxas de congelação. Encontraram melhores resultados utilizando a congelação lenta (3,85°C/min) até -40°C, quando as palhetas foram imersas em

nitrogênio líquido. Obtiveram queda de motilidade espermática de 20,9 pontos percentuais e uma elevação na incidência de defeitos de acrossomo de 16 pontos, enquanto o obtido neste experimento foi de 19 pontos percentuais para a perda de motilidade espermática e 19 pontos de elevação da porcentagem de defeitos de acrossomo (média entre as duas técnicas de colheita).

No presente estudo, embora não tenha sido possível precisar a taxa de congelção utilizada antes na imersão das palhetas em nitrogênio líquido, sabe-se que foi superior aos 3,85°C utilizados por Zambelli *et al.* (2002). Os resultados obtidos para motilidade e integridade de acrossomo, entretanto, foram semelhantes aos daquele estudo. A taxa de resfriamento utilizada pelos autores (12°C/min) pode ter sido excessivamente alta em relação aos 0,5°C/min sugerido por Pukazhenthil *et al.* (1999). A taxa média utilizada neste experimento foi inferior a 0,5°C/min, o que pode ter minimizado a ocorrência de lesões de acrossomo, pelo menos no que se refere à análise realizada pela coloração de “Pope”.

A análise estatística revelou divergências significativas ($p < 0,05$) entre as duas técnicas na porcentagem de espermatozoides normais e defeitos menores (Tabelas 36 e 37). Isto ocorreu devido à alta incidência de defeitos menores (gota citoplasmática distal) no sêmen colhido do epidídimo, ainda mais porque a análise estatística comparou as técnicas de colheita de sêmen pela variação relativa dos momentos e, como se observa na Tabela 31, houve um decréscimo na porcentagem de defeitos menores que esteve relacionado à diminuição do número de espermatozoides que apresentavam gota citoplasmática distal (29,2% no momento inicial para 10,4% após a descongelção). Acredita-se que o processamento do sêmen, principalmente a ação mecânica da centrifugação possa ter resultado no decréscimo deste defeito.

É provável que a incidência mais elevada de defeitos menores no sêmen descongelado do epidídimo (36,3% contra 27,0% da eletroejaculação) não seja um fator muito relevante para a capacidade fertilizante do sêmen, já que a diferença entre as médias não é exorbitante e o impacto dos defeitos menores sobre a fertilidade é, como o próprio nome diz, menor.

Tabela 36. Medidas descritivas para morfologia do sêmen do gato doméstico (*Felis catus*) - espermatozóides normais - colhido por eletroejaculação e do epidídimo, segundo a variação relativa (%) dos momentos pós-criopreservação e *in natura*, Botucatu, 2004.

<i>Medida Descritiva</i>	<i>Técnica</i>		<i>Resultado do Teste Estatístico</i>
	<i>Eletroejaculação</i>	<i>Epidídimo</i>	
Média	-19,88	71,88	7,00 (p < 0,05)
Desvio Padrão	43,61	99,23	
Valor Mínimo	-56,14	-27,27	
Mediana	-32,16	36,01	
Valor Máximo	76,92	314,29	

Tabela 37. Medidas descritivas para morfologia do sêmen do gato doméstico (*Felis catus*) - defeitos menores - colhido por eletroejaculação e do epidídimo, segundo a variação relativa (%) dos momentos pós-criopreservação e *in natura*, Botucatu, 2004.

<i>Medida Descritiva</i>	<i>Técnica</i>		<i>Resultado do Teste Estatístico</i>
	<i>Eletroejaculação</i>	<i>Epidídimo</i>	
Média	-3,56	-38,42	8,00 (p < 0,05)
Desvio Padrão	42,93	19,53	
Valor Mínimo	-58,73	-74,29	
Mediana	-8,31	-33,01	
Valor Máximo	63,64	-12,00	

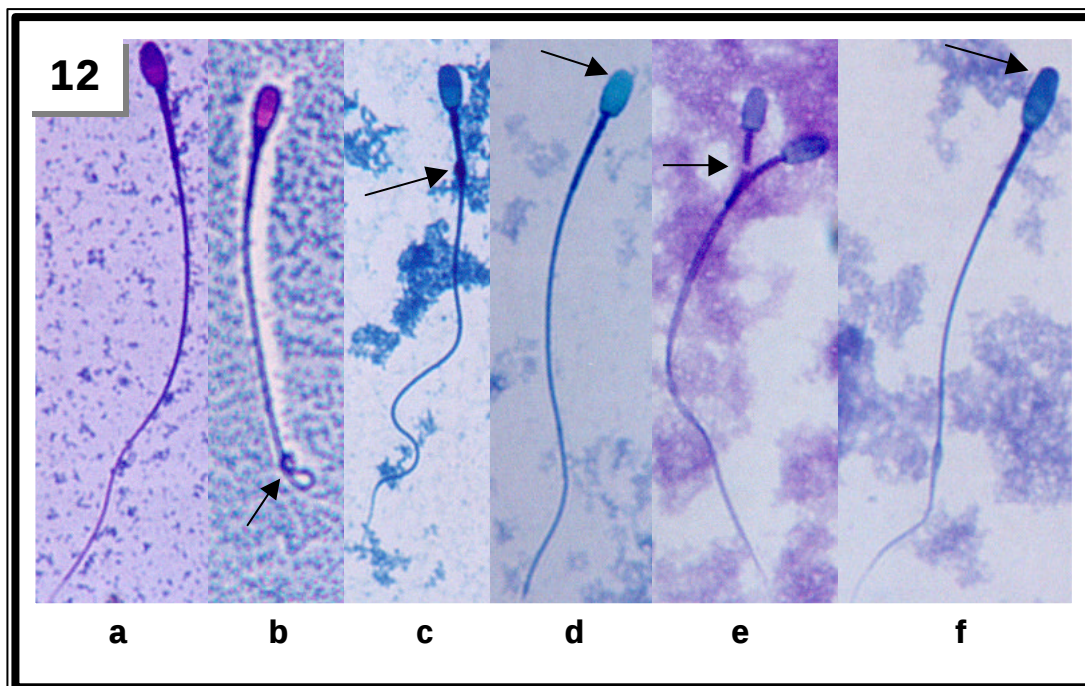


Figura 12. Morfologia espermática utilizando coloração simples de “Pope” para sêmen descongelado de gato doméstico (*Felis catus*) proveniente de duas técnicas de colheita, a eletroejaculação (EL) e a colheita do epidídimo e ducto deferente (EP) (1000x). a) Espermatozóide normal. b) Cauda enrolada e alteração de colo em sêmen descongelado (EL). c) Gota citoplasmática distal em sêmen descongelado (EP). d) Ausência de acrossomo em sêmen descongelado (EL). e) Cabeça dupla em sêmen descongelado (EL). f) Protrusão de acrossomo em sêmen descongelado (EL), Botucatu, 2004.

Conforme já foi relatado, não houve variação significativa para os defeitos maiores quando se compararam as duas técnicas de colheita. De maneira geral, o sêmen descongelado apresentou uma elevação marcante na porcentagem de defeitos maiores em relação ao *in natura*, como era de se esperar, devido ao aumento das lesões acrossomais (Figura 12d e 12f) resultantes do processo de criopreservação (22,9 pontos percentuais para o sêmen eletroejaculado e 16,1 pontos para o sêmen do epidídimo).

Tabela 38. Medidas descritivas para morfologia do sêmen do gato doméstico (*Felis catus*) - defeitos maiores - colhido por eletroejaculação e do epidídimo, segundo a variação relativa (%) dos momentos pós-criopreservação e *in natura*, Botucatu, 2004.

<i>Medida Descritiva</i>	<i>Técnica</i>		<i>Resultado do Teste Estatístico</i>
	<i>Eletroejaculação</i>	<i>Epidídimo</i>	
Média	167,98	154,06	25 (p > 0,05)
Desvio Padrão	98,99	157,51	
Valor Mínimo	6,06	-11,11	
Mediana	155,84	141,67	
Valor Máximo	346,15	537,50	

ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL

A análise ultraestrutural revelou que, após a criopreservação, os espermatozóides do gato doméstico apresentaram alterações de acrossomo em diferentes graus, a despeito da técnica de colheita. As alterações variaram desde distensão da membrana acrossomal externa sem ruptura, mas com alteração de conteúdo (Figura 13a, 13d), distensão da membrana acrossomal externa com ruptura e processo inicial de vesiculação, sem perda de conteúdo acrossomal (Figura 13c), perda da membrana acrossomal externa e membrana plasmática com vesiculação e perda completa do conteúdo acrossomal (Figura 13b).

Observou-se espermatozóides com distensão de membrana acrossomal externa, semelhante a edema, em sêmen descongelado colhido do epidídimo. Esta alteração pode ser resultado de choque osmótico durante o processamento do sêmen. A utilização da pré-diluição com solução fisiológica (308 mOsm/kg) seria plausível, se esta não tivesse a osmolaridade próxima à do sêmen (329 mOsm/kg) (Johnston *et al.*, 2001).

Embora não tenha sido feita uma análise quantitativa das alterações ultraestruturais dos espermatozóides devido à quantidade de material reduzida apresentada para análise, verificou-se que, assim como nas espécies *Leopardus tigrinus* e *L. pardalis*, os gatos domésticos também apresentaram grande parte dos espermatozóides com alterações de acrossomo após a criopreservação, embora em microscopia óptica apenas 28,3% (eletroejaculação) e 23,5% (epidídimo) das lesões fossem relacionadas a acrossomo.

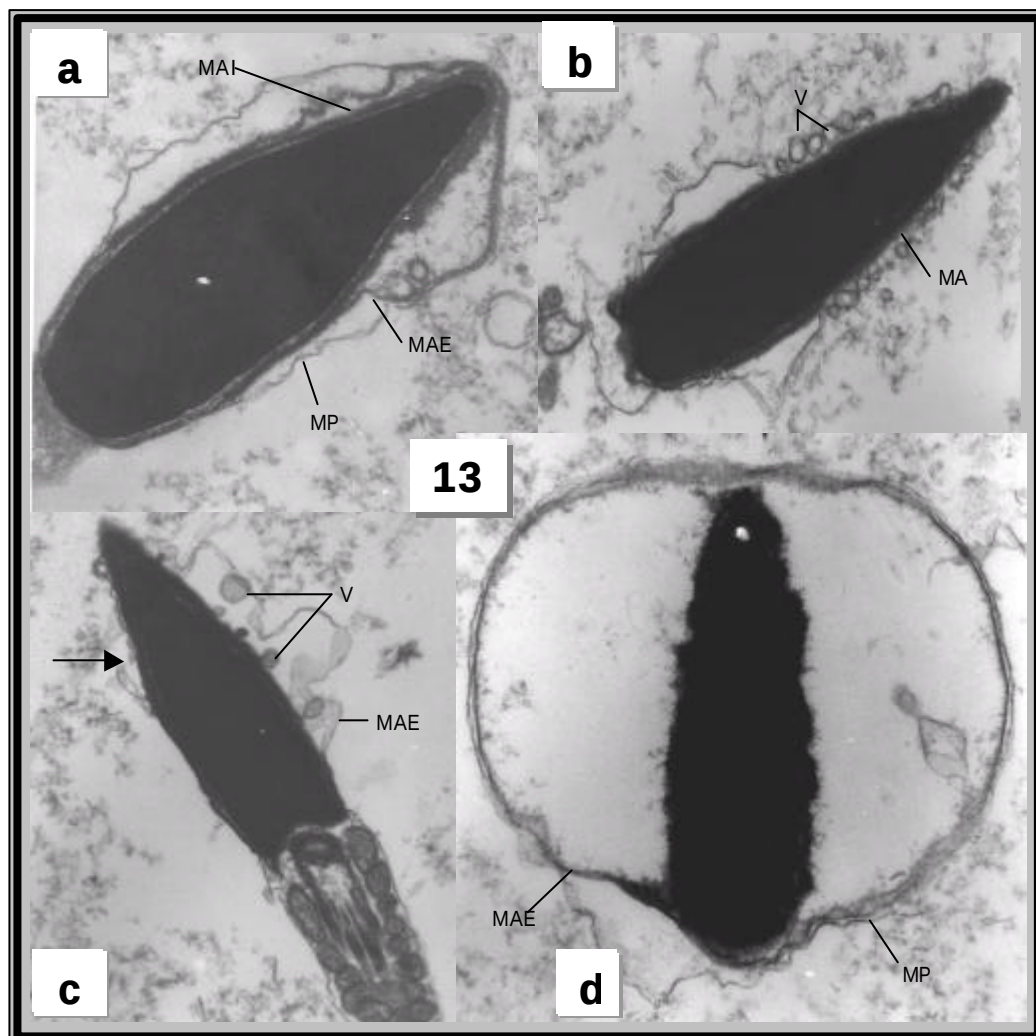


Figura 13. Ultraestrutura espermática do sêmen descongelado do gato doméstico (*Felis catus*), oriundo de eletroejaculação (EL) e da colheita do epidídimo e ducto deferente (EP). a) Espermatozóiide mostrando distensão de membrana acrossomal externa (MAE), alteração de conteúdo e membrana acrossomal interna (MAI) aderida ao núcleo (EL) (42000x). b) Vesiculação de acrossomo, MAI aderida ao núcleo (EP) (31500x). c) Distensão e ruptura da MAE (seta), manutenção na homogeneidade de conteúdo (23000x) (EP). d) Distensão de membrana plasmática (MP) e MAI, semelhante a edema, heterogeneidade de conteúdo e membrana MAI aderida ao núcleo (EP) (42000x), Botucatu, 2004.

DISCUSSÃO GERAL

As causas para as lesões de acrossomo podem estar ligadas à inadequação do método utilizado para congelação do sêmen, como a concentração de glicerol utilizada, o tempo de exposição ao glicerol durante o período de equilíbrio, ou ainda a adição do glicerol em temperatura ambiente. Outros aspectos, como a adição do detergente (Equex) antes do período de equilíbrio, expondo a célula espermática à esta ação por uma hora, e taxa utilizada para queda de temperatura durante a congelação, provavelmente interferiram neste resultado.

Pukazhenth *et al* (1999) observaram que gatos teratospérmicos eram mais sensíveis que gatos normospérmicos a curvas rápidas de resfriamento do sêmen. Os gatos utilizados para este experimento eram bastante heterogêneos quanto à porcentagem de espermatozóides pleiomórficos no sêmen (25 a 74% em sêmen eletroejaculado e 53 a 93% em sêmen do epidídimo). Para minimizar os danos às membranas acrossomais durante a fase de resfriamento, foi utilizada uma taxa média de resfriamento inferior a 0,5°C/min.

A taxa de congelação não foi monitorada, mas é certo que pode interferir sobre a viabilidade do espermatozóide descongelado, causando estresse osmótico ou lesões de membrana devido à formação de cristais de gelo no interior da célula. Pukazhenth *et al* (1997), estudaram as propriedades da condutibilidade hidráulica da membrana plasmática do espermatozóide do gato doméstico e é possível que estes novos dados tragam informações sobre taxas ideais para congelação de sêmen para os felinos domésticos e selvagens, aprimorando a técnica e possibilitando a obtenção de sêmen mais viável para utilização em biotécnicas reprodutivas.

De qualquer forma, apesar do gato doméstico ter apresentado a média da porcentagem de espermatozóides pleiomórficos elevada no sêmen *in natura*, o sêmen do gato doméstico manteve melhor suas características que, por exemplo, o gato-do-mato-pequeno, que também mostrou porcentagem de espermatozóides pleiomórficos relativamente alta. É possível que a célula espermática do gato doméstico seja mais resistente aos estresses gerados pela congelação e descongelação, ou ainda, que o alto índice de contaminação por urina tenha comprometido os espermatozóides do gato-do-mato-pequeno.

Os resultados de todas as análises efetuadas, motilidade, vigor, morfologia em microscopia óptica ou de transmissão, integridade de membrana, levam a crer que não há diferenças relevantes na resposta do sêmen oriundo das duas diferentes técnicas de colheita, frente à criopreservação. Para confirmar este resultado seria necessário testar estes semens em ensaios de penetração.

O quadro apresentado pela análise ultraestrutural revelou que a célula espermática foi severamente afetada pelo processo de criopreservação, tanto no gato doméstico como nas espécies *L. tigrinus* e *L. pardalis*. É possível que, de maneira geral, o sêmen criopreservado pela metodologia utilizada, independente da espécie, não responda bem aos testes de penetração. A escassa literatura revela que a utilização de biotécnicas de reprodução utilizando sêmen criopreservado, em felinos, ainda encontra muitas limitações, apresentando uma eficiência baixa (Byers *et al.*, 1989; Goodrowe e Hay, 1993; Farstad, 2000; Luvoni *et al.*, 2003a, Luvoni *et al.*, 2003b). Todos estes dados confirmam a necessidade de aperfeiçoar as técnicas já utilizadas para congelação e descongelação de sêmen, a fim de que o sêmen congelado possa ser considerado um recurso genético viável.

CONCLUSÕES

Os dois experimentos apresentados permitem concluir que:

1. Considerando-se o número de animais estudados, não foi possível identificar diferenças entre a eficiência dos diluentes (TEG e MP-50) utilizados para congelar o sêmen de *Leopardus tigrinus* e *Leopardus pardalis*.
2. O sêmen de *Leopardus pardalis* apresentou melhor qualidade após a descongelação, mostrando-se mais resistente ao estresse decorrente da criopreservação do que o sêmen de *Leopardus tigrinus*.
3. Não houve diferença entre a resposta da célula espermática colhida por duas técnicas, a eletroejaculação e do epidídimo, quando submetidas à criopreservação, no gato doméstico (*Felis catus*).
4. O processo de criopreservação do sêmen nas três espécies estudadas, *Leopardus tigrinus*, *Leopardus. pardalis* e *Felis catus*, resultou em alterações severas da integridade acrossomal, observadas em microscopia eletrônica de transmissão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMANN, R.P., PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Equine Vet. Sci.**, v.7, p.143-73, 1987.

AURICH, J.E., KÜHNE, A., HOPPE, H, AURICH, C. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after criopreservation. **Theriogenology**, v.46, p.791-7, 1996.

AXNÈR, E., STRÖM, B., LINDE-FOSBERG, C. Sperm morphology is better in the second ejaculate than in the first in domestic cats electroejaculated twice during the same period anesthesia. **Theriogenology**, v.47, p.929-34, 1997.

AXNÈR, E., STRÖM HOLST, B., LINDE-FOSBERG, C. Morphology of spermatozoa in the cauda epididymidis before and after electroejaculation and a comparison with ejaculated spermatozoa in the domestic cat. **Theriogenology**, v.50, p.973-9, 1998.

AXNÈR, E., LINDE-FOSBERG, C., EINARSSON, S. Morphology and motility of spermatozoa from different regions of the epididymal duct in the domestic cat. **Theriogenology**, v.52, p.767-78, 1999.

AXNÈR, E., LINDE-FOSBERG, C. Semen collection and assessment, and artificial insemination in cat. In: CONCANNON, P.W., ENGLAND, G., VERSTAGEN, J., LINDE-FORSBERG. **Recent advances in small animal reproduction**. Ithaca: Internacional Veterinary Information Service, disponível em: < <http://www.ivis.org> >. Acesso em 15 ago.2002.

- BAINBRIDGE, D.R.J., JABBOUR, H.N. Potential of assisted breeding techniques for the conservation of endangered mammalian species in captivity: a review. **Vet. Rec.**, v.143, p.159-68, 1998.
- BALL, B.A., VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. **J. Androl.**, v.22, p.1061-9, 2001.
- BARONE, M.A., ROELKE, M.E., HOWARD, J.G., BROWN, J.L., ANDERSON, A.E., WILDT, D.E. Reproductive characteristics of male Florida panthers: comparative studies from Florida, Texas, Colorado, Latin America, and North American zoos. **Journal of Mammalogy**, v.75, p.250-62, 1994.
- BARTH, A.D., OKO, R.J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Iowa: Iowa State University Press, 1989. p.214-70.
- BEDFORD, J.M. Sperm capacitation and fertilization in mammals. **Biol. Reprod. Suppl.**, v.2, p.128-58, 1970.
- BRINSKO, S.P., CROCKETT, E.C., SQUIRES, E.L. Effect of centrifugation and partial removal of plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. **Theriogenology**, v.54, p.29-136, 2000.
- BYERS, A.P., HUNTER, A.G., SEAL, U.S., BINCZIK G.A., REINDL, N.J., TILSON, R.L. In-vitro induction of capacitation of fresh and frozen spermatozoa of the Siberian tiger (*Panthera tigris*). **J. Reprod. Fertil.**, v.86, p.599-607, 1989.
- CHIRINÉA, V.H., MARTINS, M.I.M., SOUZA, F.F., TEBET, J.M., LOPES, M.D., PAPA, F.O., TRINCA, L.A. Efeito da suplementação de diferentes açúcares no meio de congelamento de sêmen de cães. CONGRESSO DE INTEGRAÇÃO EM BIOLOGIA DA REPRODUÇÃO, 2003, Ribeirão Preto, **Anais...**, Ribeirão Preto, 2003. CD-ROM.

COMERCIO, E.A., MONACHESI, N.E., WANKE, M.M. Use a commercial extender for cat semen evaluation. **Theriogenology**, v.57, p.372, 2002. (abstracts)

DE LEEUW, F.E., DE LEEUW, A.M., DEN DAAS, J.H.G., COLENBRANDER, B., VERKLEIJ, A.J. Effects of various cryoprotective agents and membranes-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. **Cryobiology**, v.30, p.32-44, 1993.

DEVIREDDY, R.V., SWANLUND, D.J., ROBERTS, K.P., BISCHOF, J.C. Subzero water permeability parameters of mouse spermatozoa in the presence of extracellular ice and cryoprotective agents. **Biol. Reprod.**, v.61, p.764-75, 1999.

DEVIREDDY, R.V., SWANLUND, D.J., ALGHAMDI, A.S., DUOOS, L.A., TROEDSSON, M.H.T., BISCHOF, J.C., ROBERTS, K.P. Measured effect of collection and cooling conditions on the motility and the water transport parameters at subzero temperatures of equine spermatozoa. **Reproduction**, v.124, p.643-8, 2002.

DONOGHUE, A.M., JOHNSTON, L.A., SEAL, U.S., ARMSTRONG, D.L., SIMMONS, L.G., GROSS, T., TILSON, R.L., WILDT, D.E. Ability of thawed tiger (*Panthera tigris*) spermatozoa to fertilize nonspecific eggs and bind and penetrate domestic cat eggs in vitro. **J. Reprod. Fertil.**, v.96, p.555-64, 1992.

DOOLEY, M.P., PINEDA, M.H. Effects of method of collection on seminal plasma characteristics of the domestic cat. **Am. J. Vet. Res.**, v.47, p.286-92, 1986.

DOOLEY, M.P., PINEDA, M.H., HOPPER, J.G., HSU, W.H. Retrograde flow of spermatozoa into the urinary bladder of cats during electroejaculation, collection of semen with an artificial vagina, and mating. **Am. J. Vet. Res.**, v.52, p.687-91, 1991.

EISENBERG, J.F., REDFORD, K.H. **Mammals of the neotropics**. Chicago: University of Chicago, 1992. v.2, p.163-78.

- FARSTAD, W. Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. **Anim. Reprod. Sci.**, v.60-61, p.375-87, 2000.
- FELDMAN, E.C., NELSON, R.W. **Canine and feline endocrinology and reproduction**. 2.ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1996. p.529-46, 741-52.
- FRANÇA, L.R., GODINHO, C.L. Histometria testicular, ciclo do epitélio seminífero e produção espermática diária em gatos domésticos sexualmente maduros. **Braz. J. Morphol. Sci. Suppl.**, v.17, p.169, 2000.
- GAO, D.Y., LIU, J., LIU, C., McGANN, L.E., WATSON, P.F., KLEINHANS, F.W., MAZUR, P., CRITSER, E.S., CRITSER, J.K. Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. **Hum. Reprod.**, v.10, p.1109-22, 1995.
- GIL, J., LUNDEHEIM, N., SÖDERQUIST, L., RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in raw semen. **Theriogenology**, v.59, p.1241-55, 2003.
- GILMORE, J.A., McGANN, L.E., ASHWORTH, E., ACKER, J.P., RAATH, J.P., BUSH, M., CRITSER J.K. Fundamental cryobiology of selected African mammalian spermatozoa and its role in biodiversity preservation through the development of genome resource banking. **Reprod. Sci.**, v.53, p.277-97, 1998.
- GOODROWE K.L., HOWARD, J., 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. Suppl.**, v.39, 73-90, 1989.
- GOODROWE, K.L., HAY, M. Characteristics and zona binding ability of fresh and cooled domestic cat epididymal spermatozoa. **Theriogenology**, v.40, p.967-75, 1993.
- GRAHAM, L.H., SWANSON, W.F., BROWN, J.L. Chorionic gonadotropin administration in domestic cats causes an abnormal endocrine environment that disrupts oviductal embryo transport. **Theriogenology**, v.54, p.1117-31, 2000.

- HAMMERSTEDT, R.H., GRAHAM, J.K. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. **Cryobiology**, v.29, p.26-38, 1992.
- HARRIS, R.F., POPE, C.E., GOMEZ, M.C., LEIBO, S.P., DRESSER, B.L. Storage of domestic cat spermatozoa for extended periods at 4°C. **Theriogenology** (abstracts), v.55(1), p.308, 2001.
- 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 4°C. **Theriogenology**, v.57, p.365, 2002. (abstract)
- HARRISON, R.A.P., VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **J. Reprod. Fertil.**, v.88, p.343-52, 1990.
- HAY, M.A., GOODROWE, K.L. Comparative cryopreservation and capacitation of spermatozoa from epididymides and vasa deferentia of the domestic cat. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.47: 297-305, 1993.
- HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v.62, p.3-22, 2000a.
- HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v.53, p.47-58, 2000b.
- HOWARD, J.G., BROWN, J.L., BUSH, M., WILDT, D.E. Teratospermic and normospermic domestic cats: ejaculate traits, pituitary-gonadal hormones, and improvement of spermatozoal motility and morphology after swimming up processing. **J. Androl.**, v.11, p.204-15, 1990.
- HOWARD, J.G. Semen collection and analysis in carnivores. In: FOWLER, M.E. **Zoo and wild animal medicine: current therapy**. 3.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1993, p.390-9.
- JASKO, D.J. Procedures for cooling and freezing of equine semen. **Ars Vet.**, v.10, p.156-65, 1994.

JEYENDRAN, R.S., VAN DER VEN, H.H., PEREZ-PELAEZ, M, CRABO, B.G., ZANEVELD, L.J. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **J. Reprod. Fertil.**, v.47, p.219-28, 1984.

JOHNSON W.E., O'BRIEN S.J. Phylogenetic reconstruction of the Felidae using 16S rRNA and NADH-5 mitochondrial genes. **J. Mol. Evol.** , v.44, p.98-116, 1997.

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 OF ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 11, 1988, Dublin. **Proceedings...**Dublin, 1988. v.4, p.560.

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

LASLEY, B.L., LOSKUTOFF, N.M., ANDERSON, G.B. The limitation of conventional breeding programs and the need and promise of assisted reproduction in nondomestic species. **Theriogenology**, v.41, p.119-32, 1994.

LEIBO, S.P., SONGSASEN, N.. Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species. **Theriogenology**, v.57, p.303-26, 2002.

LEIPOLD, S.D., GRAHAM, E.L., SQUIRES, E.L., McCUE, P.M., BRINSKO, S.P., VANDERWALL, D.K. Effect of spermatozoal concentration and number on fertility of frozen equine semen. **Theriogenology**, v.49, p.1537-43, 1998.

LIN, M.H., MORSHEDI, M., SRISOMBUT, C., NASSAR, A., OEHNINGER, S. Plasma membrane integrity of cryopreserved human sperm: an investigation of the results of the

hypoosmotic swelling test, the water test, and eosin-Y staining. **Fertil. Steril.**, v.70, p.1148-55, 1998.

LONG, J.A., WILDT, D.E., WOLFE, B.A., CRITSER, J.K., DeROSSI, R.V., HOWARD, J.G. Sperm capacitation and acrossome reaction are compromised in teratospermic domestic cats. **Biol. Reprod.**, v.54, p.638-46, 1996.

LOVELOCK, J.E., POLGE, C. The immobilization of spermatozoa by freezing and thawing and the protective action of glycerol. **Biochem. J.**, v.58, 618-22, 1954.

LUVONI, G.C., KALCHSCHIMIDT, E., LEONI, S., RUGGIERO, C. Conservation of feline semen – part I: cooling and freezing protocols. **J. Feline Med. Surg.**, v.5, p.203-8, 2003a.

MACINTOSH, B.R. Role of calcium sensitivity modulation in skeletal muscle performance. **News Physiol. Sci.**, v.18, p.222-5, 2003.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **Am. J. Physiol.**, v.247, p.125-42, 1984.

MAZUR, P., KOSHIMOTO, C. Is intracellular ice formation the cause of death of mouse sperm frozen at high cooling rates? **Biol. Reprod.**, v.66, p.1485-90, 2002.

MEDRANO, A., WATSON, P.F., HOLT, W.V. Importance of cooling rate and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights for the cryomicroscope. **Reproduction**, v.123, p.315-22, 2002.

MELLEN, 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.

MORAIS, R.N., MOREIRA, N., MORAES, W., MUCCIOLO, R.G., LACERDA, O., GOMES, M.L.F., SWANSON, W.F., GRAHAM, L.H., BROWN, J.L. Testicular and ovarian function in South American small felids assessed by fecal steroids. In: JOINT CONFERENCE AMERICAN ASSOCIATION OF ZOO VETERINARIANS, 11, 1996, Puerto Vallarta. **Proceedings...** Puerto Vallarta, 1996. p.561-5.

MORAIS, R.N., MUCCIOLO, R.G., GOMES, M.L.F., LACERDA, O., MORAES, W., MOREIRA, N., SWANSON, W.F., BROWN, J.L. Adrenal activity assessed by fecal corticoids and male reproductive traits in three South American felid species. In: JOINT CONFERENCE AMERICAN ASSOCIATION OF ZOO VETERINARIANS, 12, 1997, Houston. **Proceedings...** Houston, 1997. p.220-2.

MORAIS, R.N. **Fisiologia reprodutiva de pequenos felinos (*Leopardus pardalis*, LINNAEUS 1758; *Leopardus wiedii*, SCHINZ, 1821; e *Leopardus tigrinus*, SCHREBER, 1775): sobre a função testicular (gametogênica e esteroidogênica) de machos em cativeiro, incluindo variações sazonais.** Curitiba, 1999. 177p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná.

MORAIS, R.N., MUCCIOLO, R.G., GOMES, M.L.F., LACERDA, O., MORAES, W., MOREIRA, N., GRAHAM, L.H., SWANSON, W.F., BROWN, J.L. Seasonal analysis of semen characteristics, serum testosterone and fecal androgens in the ocelot (*Leopardus pardalis*), margay (*Leopardus wiedii*) and tigrina (*Leopardus tigrinus*). **Theriogenology**, v.57, p.2027-41, 2002.

MORATO, R.G., GUIMARÃES, M.A.B.V., NUNES, A.L.V., TEIXEIRA, R.H., CARCIOFI, A.C., FERREIRA, F., BARNABE, V.H., BARNABE, R.C. Colheita e avaliação espermática em onça pintada (*Panthera onca*). **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.35, p. 178-81, 1998.

MORATO, R.G., CONFORTI, V.A., AZEVEDO, F.C., JACOMO, A.T.A., SILVEIRA, L., SANA, D., NUNES, A.L.V., GUIMARAES, M.A.B.V., BARNABE, R.C. Comparative

analyses of semen and endocrine characteristics of free-living versus captive jaguars (*Panthera onca*). **Reproduction**, v.122, p.745-751, 2001.

MOREIRA, N. **Reprodução e estresse em fêmeas de felídeos do gênero *Leopardus***. Curitiba, 2001. 231p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná.

MOREIRA, N., MONTEIRO-FILHO, E.L.A., MORAIS, W., SWANSON, W.F., GRAHAM, L.H., PASQUALI, O.L., GOMES, M.L.F., MORAIS, R.N., WILDT, D.E., BROWN, J.L. Reproductive steroid hormones and ovarian activity in felids of the *Leopardus* genus. **Zoo Biol.**, v.20, p.103-16, 2001.

MULLER, C.H. Rationale, interpretation, validation, and uses of sperm function tests. Review. **J. Androl.**, v.21, p.10-30, 2000.

NASH, T. Chemical constitution and physical properties of compounds able to protect living cells against damage due to freezing and thawing. In: MERUMAN, H.T. **Cryobiology**. New York: Academic Press, 1966.p.179-220.

NEILD, D., CHAVES, G., FLORES, M., MORA, N., BECONI, M., AGÜERO, A. Hypoosmotic test in equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.51, p.721-7, 1999.

NELSON, K.L., CRICHTON, E.G., DOTY, L., VOLENEC, D.E., MORATO, R.G., POPE, C.E., DRESSER, B.L., BROWN, C.S., ARMSTRONG, D.L., LOSKUTOFF, N.M. Heterologous and homologous fertilizing capacity of cryopreserved felid sperm: a model for endangered species. **Theriogenology**, v.51, p.290, 1999. (abstract).

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

NORMAN, G.R., STREINER, D.L. **Biostatistics**: the bare essentials. St. Louis: Mosby Year Book, 1994. 260p.

- NOWAK, R.M., PARADISO, J.L. **Walker's mammals of the world**. 5.ed. Baltimore: Johns Hopkins University, 1991. v.2, p.1184-219.
- O'BRIEN, S.J., ROELKE, M.E., MARKER, L., NEWMAN, A., WINKLER, C.W., MELTZER, D., COLLY, L., EVERMAN, J., BUSH, M., WILDT, D.E. Genetic basis for species vulnerability in the cheetah. **Science**, v.227, p.1428-35, 1985.
- O'BRIEN, S.J. Molecular genetics and phylogenetics of the Felidae. In: NOWEL, K., JACKSON, P. **Wild cats: status survey and conservation action plan**. Cambridge: Burlington, 1996. p.23-4.
- OLIVEIRA, J.V.L., MARTINS, J.L.A., NORBERTO, G., HLAVNICKA, M., CARAPIÁ, D., RIBEIRO-FILHO, A.L., ADANI, C., De PAULA, T. Criopreservação de sêmen de suçuarana (*Puma concolor*) utilizando meios lactose gema de ovo e tris gema de ovo. CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICOS VETERINÁRIOS - CONBRAVET, 28, 2001, Goiânia. **Anais...**Goiânia, 2001. CD-ROM.
- OLIVEIRA, T. G. **Neotropical cats: ecology and conservation**. São Luiz: EDUFMA, 1994. 220p.
- OSBORNE, C.A., FINCO, D.R. **Canine and feline nephrology and urology**. Baltimore: Lea & Febiger. 1995.p.295.
- PAPA, F.O., ZAHN, F.S., DELL'AQUA Jr., J.A, ALVARENGA, M.A. Utilização de diluente MP-50 para criopreservação de sêmen eqüino. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, v.26, p.184-7, 2002.
- PEÑA, A.I., LUZ, L.L., BARRIO, M., HERRADÓN, P.G., QUINTCLA, L.A. Effect of Equex from different sources on post-thaw survival, longevity and intracellular Ca^{2+} concentration of dog spermatozoa. **Theriogenology**, v.59, p.1725-39, 2003.

- PENFOLD L.M., JOST, L., EVENSON, D.P., WILDT, D.E. Normospermic versus teratospermic domestic cat sperm chromatin integrity evaluated by flow cytometry intracytoplasmic sperm injection. **Biol. Reprod.**, v.69, p.1730-5, 2003.
- PINEDA, M.H., DOOLEY, M.P. Effects of voltage and order of voltage application on seminal characteristics of electroejaculates of the domestic cat. **Am. J. Vet. Res.**, v.45, p.1520-5, 1984.
- PLATZ, C.C., SEAGER, S.W.J. Semen collection by electroejaculation in the domestic cat. **J. Anim. Vet. Med. Assoc.**, v.173, p.1353-5, 1978.
- PLATZ, C.C., WILDT, D.E., SEAGER, S.W.J. Pregnancy in domestic cat after artificial insemination with previously frozen spermatozoa. **J. Reprod. Fertil.**, v.52, p.279-82, 1978.
- POPE, C.E., ZHANG, Y.Z., DRESSER, B.L. A simple staining method for evaluating acrossomal status of cat spermatozoa. **J. Zoo Wild. Med.**, v.22, p.87-95, 1991.
- POPE, C.E. Embryo technology in conservation efforts for endangered felids. **Theriogenology**, v.53, p.163-74, 2000.
- POPESKO, P. **Atlas de anatomia topográfica dos animais domésticos**. São Paulo: Manole Ltda, 1985, v.3, p.194.
- PUKAZHENTHI, B.S., ELMOAZZEN, H., SPINDLER, R., WILDT, D.E., HOWARD, J.G., MCGANN, L. Hydraulic conductivity and its temperature dependence in spermatozoa from teratospermic felids. ANNUAL MEETING OF CANADIAN SOCIETY OF ZOOLOGISTS, 36, 1997, Ontario, **Proceedings...**, Ontario, 1997.
- PUKAZHENTHI, B.S., PELICAN, K., WILDT, D.E., HOWARD, J.G. Sensitivity of domestic cat (*Felis catus*) sperm from normospermic versus teratospermic donors to cold-induced acrossomal damage. **Biol. Reprod.**, v.61, p.135-41, 1999.

PUKAZHENTHI, B.S., NOILES, E., PELICAN, K., DONOGHUE, A., WILDT, D.E., HOWARD, J.G. Osmotic effects on feline spermatozoa from normospermic versus teratospermic donors. **Cryobiology**, v.40, p.139-50, 2000.

PUKAZHENTHI, B.S., WILDT, D.E., HOWARD, J.G. The phenomenon and significance of teratospermia in felids. **J. Reprod. Fert. Suppl.**, v.57, p.423-33, 2001.

PUKAZHENTHI, B.S., SPINDLER, R., WILDT, BUSH, L.M., D.E., HOWARD, J.G. Osmotic properties of spermatozoa from felids producing different proportions of pleiomorphisms: influence of adding and removing cryoprotectant. **Cryobiology**, v.44, p. 288-300, 2002.

RALLS, K., BRUGGER, K., BALLOU, J. Inbreeding and juvenile mortality in small populations of ungulates. **Science**, v.206, p.1101-3, 1979.

RAO, A.R., BANE, A., GUSTAFSSON, B.K. Changes in the morphology of spermatozoa during their passage through the genital tract in dairy bulls with normal and impaired spermatogenesis. **Theriogenology**, v.14, p.1-12, 1980.

ROBINSON, R. Citogenetics of the Felidae. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE WORLD'S CATS, 3, 1974, Washington. **Proceedings...** Washington: University of Washington, 1974. p.63-8

SALOMON, S., MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v.62, p.77-111, 2000.

SAUNDERS, K.M., PARKS, J.E. Effects of cryopreservation procedures on the cytology and fertilization rate of in vitro-matured bovine oocytes. **Biol. Reprod.**, v.61, p.178-87, 1999.

SCHÄFER, S., HOLZMANN, A. The use of transmigration and Spermactm stain to evaluate epididymal cat spermatozoa. **Anim. Reprod. Sci.** v.59, p.201-11, 2000.

- SLATTERY, J.P., JOHNSON, W.E., GOLDMAN, D., O'BRIEN, S.J. Phylogenetic reconstruction of South American felids defined by protein electrophoresis. **J. Mol. Evol.**, v.39, p.296-305, 1994.
- SLAVIK, T. Effect of glycerol on the penetrating ability of fresh ram spermatozoa with zona-free hamster eggs. **J. Reprod. Fertil.**, v.79, p.99-103, 1987.
- SPINDLER, R.E., WILDT, D.E. Circannual variations in intraovarian oocyte but not epididymal sperm quality in domestic cat. **Biol. Reprod.**, v.61, p.188-94, 1999.
- SPUNGIN, B., MARGALIT, I., BREITBART, H. Sperm exocytosis reconstructed in a cell free system. Evidence for involvement of phospholipase C and actin filaments in membrane fusion. **J. Cell Sci.**, v. 108, 2525-35, 1995.
- STRÖM, B., ROTA, A., LINDE-FOSBERG, C. In vitro characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation. **Theriogenology**, v.48, p.247-56, 1997.
- SWANSON, W.F. WILDT, D.E., CAMBRE, R.C., CITINO, S.B., QUIGLEY, K.B., BROUSSET, D., MORAIS, R.N., MOREIRA, N., O'BRIEN, S.J., JOHNSON, W.E. Reproductive survey of endemic felid species in Latin American zoos: male reproductive status and implications for conservation. In: JOINT CONFERENCE AMERICAN ASSOCIATION OF ZOO VETERINARIANS, 10, 1995, Houston. **Proceedings...** Houston, 1995. p.374-80.
- SWANSON, W.F., HOWARD, J.G., ROTH, T.L., ALVARADO, T., BURTON, M., STARNES, D., WILT, D.E. Responsiveness of ovaries to exogenous gonadotrophins and laparoscopic artificial insemination with frozen-thawed spermatozoa in ocelots (*Felis pardalis*). **J. Reprod. Fertil.**, v.106, p.87-94, 1996a.
- SWANSON, W.F., ROTH, T.L., BLUMER, E., CITINO, S.B., KENNY, D., WILDT, D.E. Comparative cryopreservation and functionality of spermatozoa from the normospermic jaguar (*Panthera onca*) and teratospermic cheetah (*Acinonyx jubatus*). **Theriogenology**, v.45, p.241, 1996b. (abstract)

SWANSON W.F., WILDT, D.E. Strategies and progress in reproductive research involving small cat species. **Int. Zoo Yearbook**, v.35, p.152-9, 1997.

TSUTSUI, T., WADA, M., ANZAI, M., HORI, T. Artificial insemination with frozen epididymal sperm in cats. **J. Vet. Med. Sci.** v. 65, p. 397-9, 2003.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Coordenadoria Geral de Bibliotecas. **Normas para publicações da UNESP**. São Paulo: Editora UNESP, 1994. v.2: Referências Bibliográficas. BIOSIS. Serial sources for BIOSIS preview database. Philadelphia, 1996. 468p.

VERSTEGEN, J. Comunicação pessoal, 2003.

WATSON, P.F. The preservation of semen in mammals. In: FINN, C. A. **Oxford reviews of reproductive biology**. New York: Oxford University Press, 1979, v.1, p.283-330.

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

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v.60-61, p.481-92, 2000.

WILDT, D.E., BUSH, M., GOODROWE, K.L., PACKER, C., PUSEY, A.E., BROWN, J.L., JOSLIN, P., BRIEN, S.J. Reproductive and genetic consequences of founding isolated lion populations. **Nature**, v.329, p.328-31, 1987.

WILDT, D.E., PHILLIPS, L.G., SIMMONS, L.G., GOODROWE, K.G., HOWARD, J.G., BROWN, J.L., BUSH, M. Seminal-endocrine characteristics of the tiger and the potential for artificial breeding. In: TILSON, R.L.; SEAL, U.S. (Eds.) **Tigers of the World: Biology, biopolitics, management and conservation of an endangered species**. Park Ridge: Noyes Publications, 1987b. p.255-79.

- WILDT, D.E. Reproductive research in conservation biology: priorities and avenues for support. **J. Zoo Wildl. Med.**, v.20, p.391-5, 1989.
- WILDT, D.E. Genetic resource banks for conserving wildlife species: justification, examples and becoming organized on a global basis. **Anim. Reprod. Sci.**, v.28, p.247-57, 1992.
- WILSON, D.E., REEDER, D.M. **Mammals species of the world:** a taxonomic and geographic reference. Washington: Smithsonian Institution, 1992. p.291.
- WOOD, T.C., SWANSON, W.F., DAVIS, R.M., ANDERSON, J.E., WILDT, D.E.. Functionality of sperm from normo versus teratospermic cats cryopreserved in pellets or straw containers. **Theriogenology**, v.39, p.342, 1993.(abstract)
- YANAGIMACHI, R. Mammalian Fertilization. In: KNOBILL, E., NEILL, J.D. **The Physiology of Reproduction**, 2.ed. New York: Raven Press, 1993. v.1, p.189-317.
- YU, I., SONGSASEN, N., GODKE, R.A, LEIBO, S.P. Differences among dogs in response of their spermatozoa to cryopreservation using various cooling and warming rates. **Cryobiology**, v.44, p.62-78, 2002.
- ZAMBELLI, D., CANEPPELE, B., CATAGNETTI, C., BELLUZZI, S. Cryopreservation of the cat semen in straws: comparison of five different freezing rates. **Reprod. Dom. Anim.**, v.37, 310-3, 2002.

RESUMO E *ABSTRACT*

Efeito da criopreservação sobre a célula espermática em três espécies de felinos: o gato-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus* – Schreber, 1775), a jaguatirica (*Leopardus pardalis* – Linnaeus, 1758) e o gato doméstico (*Felis catus*).

O objetivo geral deste estudo foi verificar o efeito do processo de congelação e descongelação sobre o sêmen de três espécies de felinos, *Leopardus tigrinus* (n = 5, 15 ejaculados), *L.pardalis* (n=5, 17 ejaculados) e *Felis catus* (n = 10). A colheita de sêmen foi realizada por eletroejaculação (experimento 1 e 2) ou colheita do epidídimo e ducto deferente (experimento 2). Os ejaculados foram processados segundo o mesmo protocolo: centrifugação, suspensão em criodiluyente, envasamento em palhetas de 0,25 mL (5×10^6 sptz), equilíbrio de uma hora a 5°C (<0,5°C/min), congelação em vapor de nitrogênio por vinte minutos e imersão. A descongelação foi efetuada a 46°C por 15 segundos. Foi analisada a ultraestrutura espermática nas três espécies para verificar os danos causados pela criopreservação. O *experimento I* testou a diferença entre a eficiência de dois criodiluyentes, o TEG (7% glicerol) e o MP-50 (3% glicerol, 2% dimetilformamida), utilizados para congelar o sêmen de *L. tigrinus* e *L. pardalis*. Os resultados mostraram que os diluyentes não diferiram nas duas espécies. *L. tigrinus* apresentou decréscimo marcante no índice de motilidade progressiva (IMP) (média de 36,3 pontos). *L. pardalis* apresentou queda menor no IMP (média de 18,1 pontos). Ambas as espécies tiveram elevação na porcentagem de defeitos maiores (média de 7,2 e 24,7 pontos percentuais, respectivamente) em função do aumento da incidência de alterações de acrossomo. A contaminação do sêmen por urina foi um fato marcante para *L. tigrinus* (53% dos ejaculados) e *L. pardalis* (59%), o que pode ter resultado em alta incidência de caudas dobradas e enroladas (23,4% e 13,3%) e sugeriu uma proporcional perda de resistência da célula espermática frente aos estresses da criopreservação. O *experimento II* utilizou o gato doméstico e testou a diferença entre duas técnicas de colheita de sêmen, a eletroejaculação e a colheita do epidídimo e ducto deferente, frente a criopreservação, no diluyente TEG. Foram realizadas a eletroejaculação e, em seqüência, a orquiectomia e colheita de sêmen proveniente dos epidídimos, no mesmo gato. Não houve diferença na resposta da célula espermática adquirida pelas duas técnicas de colheita frente à criopreservação, exceto em relação à morfologia espermática devido ao decréscimo na porcentagem de gota citoplasmática distal no sêmen proveniente do epidídimo após o processo de congelação. Houve queda no IMP (18,8 pontos) e na integridade de membrana (20,35 pontos percentuais). A despeito dos resultados obtidos, o estudo da ultraestrutura espermática revelou que, após a criopreservação, as três espécies mostraram lesões severas de acrossomo, o que pode representar um fator limitante para a fertilidade do sêmen.

Effect of cryopreservation on spermatic cell in three feline species: the tigrina (*Leopardus tigrinus* – Shreber, 1775), the ocelot (*Leopardus pardalis* – Linnaeus, 1758), and the domestic cat (*Felis catus*).

The general aim of this study was to evaluate the effect of freezing/thawing procedure on the semen of three feline species, *Leopardus tigrinus* (n=5, 15 ejaculates), *L. pardalis* (n=5, 17 ejaculates) and *Felis catus* (n=10). Semen was obtained by electroejaculation (experiment 1 and 2) or directly from epididymal and *vasa deferentia* (experiment 2) and processed by the same protocol: centrifugation (300g/10min), extending with cryodiluent, loading into 0,25 mL straws (5 x 10⁶ sptz) and storage at 5°C for one hour (<0,5°C/min), freezing in nitrogen vapor for 20 minutes and immersion. Thawing was achieved at 46°C for 15 minutes. Spermatozoa ultrastructure was analyzed to detect injuries caused by cryopreservation in the three species. *The first experiment* tested the difference on efficiency between two freezing extenders, TEG (7% glycerol) and MP-50 (3% glycerol + 2% dimetilformamide) utilized to freeze *L. tigrinus* and *L. pardalis* sperm. The results appointed that there weren't evident differences between the two cryodiluents, in both species. *L. tigrinus* exhibited a high decrease on sperm progressive motility index (PMI) (mean 36.3). *L. pardalis* showed lighter declines on PMI (mean 18,1). Both species presented elevation in percentage of major deffects (mean 7.2 and 24.7 points, respectively) due to the increase of acrossomal injuries. Sperm contamination by urine was a remarkable fact to *L. tigrinus* (53% of the ejaculates) and *L. pardalis* (59% of the ejaculates) what occasioned and caused loss of spermatic resistance to face the stress of cryopreservation. *The second experiment* studied domestic cats and tested the difference between two techniques of semen collection – the electroejaculation and the acquisition from epididymides and *vasa deferentia* – faced to cryopreservation in TEG (7% glycerol) diluent. Electroejaculation was followed by orchiectomy and epididymal acquisition of semen, in the same tom. There was no differences between the response of the spermatic cell obtained from the two techniques, faced to cryopreservation, except for sperm morphology, due to decline of distal droplets after freezing procedures (probably in response of semen centrifugation), in epididymal sêmen. Despite of the achieved results, the evaluation of spermatic cell utrastructure revealed that, after cryopreservation, all the three species showed severe acrossomal damages, that might be a limiting factor for the semen fertility.