

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

**COMPARAÇÃO ENTRE DOIS MÉTODOS DE INSEMINAÇÃO
ARTIFICIAL UTILIZANDO SÊMEN CONGELADO EM GATOS
DOMÉSTICOS (*Felis catus*)**

ANA IZABEL SILVA BALBIN VILLAVERDE

Botucatu - SP
Fevereiro 2007

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

**COMPARAÇÃO ENTRE DOIS MÉTODOS DE INSEMINAÇÃO
ARTIFICIAL UTILIZANDO SÊMEN CONGELADO EM GATOS
DOMÉSTICOS (*Felis catus*)**

ANA IZABEL SILVA BALBIN VILLAVERDE

Dissertação apresentada junto ao Programa de
Pós-Graduação em Medicina Veterinária para
obtenção do título de Mestre em Reprodução
Animal.

Orientadora: Profa. Adj. Maria Denise Lopes

Botucatu - SP
Fevereiro 2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Villaverde, Ana Izabel Silva Balbin.

Comparação entre dois métodos de inseminação artificial utilizando sêmen congelado em gatos domésticos / Ana Izabel Silva Balbin Villaverde – Botucatu : [s.n.], 2007.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2007

Orientador: Prof^a. Adjunta Dr^a. Maria Denise Lopes

Assunto CAPES: 50504002

1. Reprodução animal. 2. Gato. 3. Inseminação artificial. 4. Sêmen.

CDD 636.08245

Palavras chave: Gato doméstico; Inseminação artificial; Sêmen congelado.

COMISSÃO EXAMINADORA

Botucatu, 27 de fevereiro de 2007

Profa. Adjunto Maria Denise Lopes

Prof. Titular Frederico Ozanam Papa

Prof. Doutor Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Antonio e Almerinda por todo amor, apoio e dedicação.

Ao meu irmão Alan Rafael pelo carinho, amizade e incentivo.

Aos meus bichinhos de estimação.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar sempre ao meu lado guiando meus passos e por todas as pessoas maravilhosas que colocou em minha vida.

À professora Maria Denise Lopes, pelos ensinamentos, pela dedicação, pelo carinho ao me ouvir e por confiar em mim.

Ao professor Frederico Ozanam Papa, pelo auxílio durante o projeto, pelos ensinamentos e pelas boas risadas.

Ao professor Nereu Carlos Prestes, pelos ensinamentos e auxílio na área de obstetrícia.

Aos professores do Departamento de Reprodução Animal, João Carlos P. Ferreira, Fernanda da C. Landim e Alvarenga, Sony Dimas Bicudo, Eunice Oba, Marco Antonio Alvarenga e Cezinande de Meira por todos estes anos de boa convivência e por sempre me ajudarem quando preciso.

Ao professor Cesar Augusto Taconeli, pela realização da análise estatística e pela paciência e boa vontade ao me ensinar.

À querida amiga Cely Marini Melo, pela amizade, pela dedicação incondicional ao me ajudar durante o projeto, pelo seu grande otimismo e por me ensinar que um amigo leal é uma jóia valiosa.

Ao querido amigo Ian Martin, pela amizade, pela ajuda na realização do projeto, pelos conselhos tão carinhosos, pela extrema sinceridade e, sobretudo, pelas boas risadas nas horas mais difíceis.

À pós-graduanda Tatiana Henriques Ferreira, por ter realizado as anestésias, pela bondade em compreender as dificuldades de horário e pela preocupação, carinho e cuidado com os animais do projeto.

À Isabel da Associação de Proteção aos Animais, pelo auxílio em arrumar as gatas para o projeto.

Às amigas Cássia Orlandi, Priscila, Luciana S. Leal, Ana Augusta P. Derussi e Cláudia B. Fernandes, pela amizade, carinho e apoio.

À Viviane H. Chirinéa e Fabiana F. de Souza, por terem me recebido de braços abertos no laboratório, sempre me ajudando nas horas difíceis.

À pós-graduanda Carmen Cecília Sicherle, por ter gentilmente cedido os gatos para a realização do experimento.

À Cidinha, por ter cedido as gatas utilizadas de manequim na colheita de sêmen.

À todos os proprietários das gatas, por terem confiado em mim e pelo carinho.

Às funcionárias da pós-graduação da FMVZ, Denise, Maria e Regina, por toda a ajuda sempre com bom humor.

Aos funcionários do Departamento de Reprodução Animal, Edilson, Márcio, Walter, Tico e Cristina, pela colaboração e boa convivência.

A todas as pessoas que conviveram comigo na FMVZ durante estes anos, e que direta ou indiretamente contribuíram para a minha história.

Às empresas Purina/Nestlé e Royal Canin, pela ajuda através da doação de ração.

À FAPESP, pelo apoio financeiro.

"A sabedoria não nos é dada. É preciso descobri-la por nós mesmos, depois de uma viagem que ninguém nos pode poupar ou fazer por nós."

Marcel Proust (1871-1922)

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1.	Taxas de prenhez em gatas domésticas utilizando as técnicas de inseminação artificial intra-vaginal, intra-uterina e na tuba uterina com sêmen congelado ou fresco.....	13
QUADRO 2.	Variáveis do movimento espermático analisadas pelo método de CASA.....	31
QUADRO 3.	Classificação das células espermáticas de acordo com a ausência ou com a cor de fluorescência emitida pelas sondas em regiões do espermatozóide.....	37
QUADRO 4.	Valores do setup estabelecido para a avaliação do sêmen do gato doméstico no sistema HTR–IVOS-10, Botucatu, 2007.....	94
QUADRO 5.	Apresentação das diferentes alterações na morfologia espermática avaliadas dentro de cada categoria (defeitos maiores ou menores) na coluna à esquerda e classificação utilizada para a realização da análise dos resultados na coluna à direita.....	95

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	Número de estímulos e intensidade (V) em cada série de eletroejaculação.....	18
TABELA 2.	Composição dos diluentes TRIS/OEP e TRIS/OEP/GLICEROL utilizados para diluição e congelação do sêmen, Botucatu, 2007.....	30
TABELA 3.	Composição das soluções estoque e de trabalho das sondas fluorescentes utilizadas para a avaliação da integridade de membrana plasmática, Botucatu, 2007.....	32
TABELA 4.	Médias ($\pm$ desvio padrão) obtidas para as características espermáticas antes e após o processo de congelação/descongelação para os gatos A e B, Botucatu, 2007.....	46
TABELA 5.	Médias ($\pm$ desvio padrão) das porcentagens de IMP, MAL, RAV e APM obtidas após descongelação do sêmen para os gatos A e B utilizando a técnica descrita por Celeghini (2005), Botucatu, 2007.....	47
TABELA 6.	Quantidade de corpos lúteos (CL) e folículos ovarianos entre 2 a 5 mm e superiores a 5 mm de diâmetro, Botucatu, 2007.....	50
TABELA 7.	Resultado de prenhez para cada fêmea utilizada nos métodos de IAIU ou IAIV e número de vesículas embrionárias observadas com 18 a 21 dias após IA, dose inseminante e características das amostras seminais em cada inseminação, Botucatu, 2007.....	51
TABELA 8.	Valores de progesterona sérica (ng/ mL) obtidos de gatas domésticas durante (Momento 1) ou após 18 a 21 do procedimento de inseminação artificial (Momento 2), Botucatu, 2007.....	97

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	Dependências do gatil para os animais do experimento.....	27
FIGURA 2.	Pátio de acesso durante o dia para os animais do experimento.....	27
FIGURA 3.	Modelo de vagina artificial utilizada para a colheita de sêmen.....	29
FIGURA 4.	Colheita de sêmen com manequim animado.....	29
FIGURA 5.	Colheita de sêmen com manequim inanimado.....	29
FIGURA 6.	Lâmina de citologia vaginal coradas com Panótipo (aumento de 400x) mostrando uma gata fora da fase de estro à esquerda e uma gata na fase de estro à direita.....	39
FIGURA 7.	Inseminação artificial pelo método intra-vaginal utilizando uma sonda uretral para gatos.....	40
FIGURA 8.	Inseminação artificial intra-uterina. Deposição do sêmen no canhão do catéter.....	41
FIGURA 9.	Inseminação artificial intra-uterina. Deposição do sêmen no lúmen uterino.....	41
FIGURA 10.	Espermatozóides de gato doméstico corados com Iodeto de Propídio e Diacetato de Carboxifluoresceína. Setas brancas indicam espermatozóides com membrana plasmática intacta, corados em verde. Seta vermelha indica espermatozóide com membrana plasmática lesada, região da cabeça corada em vermelho.....	48
FIGURA 11.	Espermatozóides de gato doméstico corados com IP, FITC-PSA e JC-1. Seta azul indica lesão da membrana acrossomal, região acrossomal corada em verde. Seta vermelha indica lesão de membrana plasmática, região da cabeça corada em vermelho. Seta amarela indica alto potencial de membrana mitocondrial, pontos alaranjados ao longo da peça intermediária. Seta branca indica baixo potencial de membrana mitocondrial, peça intermediária corada em verde.....	48
FIGURA 12.	Ovários de gata doméstica após 18 a 21 dias da IA, sendo: A) ovário contendo vários CLs (seta) em sua superfície; B) ovário	

apresentando apenas folículos de até 2 mm de diâmetro (seta); C) ovários apresentando CLs (seta branca), folículos de até 5 mm de diâmetro (seta azul) e folículos maiores que 5 mm (seta preta).....50

FIGURA 13. Imagem ultra-sonográfica do útero de gata domestica gestante com visualização das vesículas embrionárias após 18 dias da IA.....52

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ALH = Deslocamento lateral da cabeça
BCF = Frequência de batimento flagelar
CL = Corpo lúteo
cm = Centímetro
eCG = Gonadotrofina coriônica eqüina
FITC-PSA = Glutina de *Pisum sativum* conjugada a isotiocianato de fluoresceína
FIV = Fertilização *in vitro*
FPOs = Folículos pré-ovulatórios
FSH = Hormônio folículo estimulante
G = Gauge
GnRH = Hormônio liberador de gonadotrofina
hCG = Gonadotrofina coriônica humana
Hz = Hertz
IA = Inseminação artificial
IAIU = Inseminação artificial intra-uterina
IAIV = Inseminação artificial intra-vaginal
IM = Intramuscular
IMP = Integridade de membrana plasmática
IP = Iodeto de propídio
JC-1 = Iodeto de 5,5',6,6'-tetracoloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina
Kg = Quilograma
L = Litro
LBD = Lipoproteínas de baixa densidade
LH = Hormônio luteinizante
LIN = Linearidade
M = Molar
m = Metro
mg = Miligrama

MHz = Megahertz

min = Minutos

mm = Milímetro

mOsm = Miliosmol

MP = Motilidade progressiva

MT = Motilidade total

ng = Nanograma

nmol = Nanomolar

OEP = Orvus ES Paste ®

pg = Picograma

R = Rápidos

s = Segundos

SC = Subcutâneo

SDS = Dodecil sulfato de sódio

STR = Índice retilíneo

TE = Transferência de embrião

TES = Ácido N-trishidroximetil-metil-2-aminometano-sulfônico

TRIS = Trishidroximetilaminometano

UI = Unidade internacional

V = Volts

VAP = Velocidade espermática ao longo de uma trajetória média

VCL = Velocidade espermática ao longo da trajetória real

vs = Versus

VSL = Velocidade ao longo de uma linha reta

μL = Microlitro

μm = Micrometro

SUMÁRIO

RESUMO	XVI
ABSTRACT	XVIII
INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVO.....	4
REVISÃO DE LITERATURA	6
1. Gata doméstica	7
1.1. Fisiologia reprodutiva	7
1.2. Indução do estro e ovulação	9
1.3. Inseminação artificial.....	13
2. Gato doméstico	17
2.1. Fisiologia reprodutiva	17
2.2. Colheita e características do sêmen	17
2.3. Criopreservação do sêmen	20
MATERIAL E MÉTODOS	26
1. Local.....	27
2. Animais	27
2.1. Machos.....	28
2.2. Fêmeas	28
3. Colheita de sêmen	28
4. Avaliação do sêmen após colheita.....	30
4.1. Movimento espermático	30
4.2. Concentração espermática	31
4.3. Integridade da membrana plasmática	32
4.4. Espermograma	33
5. Congelação do sêmen	34
6. Descongelção do sêmen	35
6.1. Cálculo da quantidade de espermatozóides por inseminação	35
6.2. Avaliação da integridade de membrana plasmática, integridade do acrossomo e função mitocondrial.....	36

7. Preparação das fêmeas para inseminação artificial	38
7.1. Observação do comportamento	38
7.2. Citologia vaginal	38
7.3. Ultra-sonografia.....	38
8. Indução do crescimento folicular e ovulação.....	39
9. Procedimento de inseminação artificial.....	39
9.1. Método intra-vaginal.....	40
9.2. Método intra-uterino	40
10. Diagnóstico e acompanhamento da gestação	42
11. Avaliação da resposta ovariana ao tratamento hormonal.....	42
12. Dosagem sérica de progesterona.....	42
13. Análise estatística	43
RESULTADOS	44
1. Qualidade do sêmen antes e após o processo de congelação/ descongelação	45
2. Resposta ovariana a indução do estro e ovulação	49
3. Resultados da inseminação artificial	51
DISCUSSÃO.....	53
CONCLUSÃO	68
BIBLIOGRAFIA	70
ANEXOS.....	93

RESUMO

VILLAVERDE, ANA IZABEL SILVA BALBIN. *Comparação entre dois métodos de inseminação artificial utilizando sêmen congelado em gatos domésticos (Felis catus)*. Botucatu, 2007. 97p. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu.

O objetivo deste estudo foi comparar a eficiência das técnicas de inseminação artificial intra-vaginal (IAIV) e intra-uterina (IAIU) com sêmen congelado/descongelado em gatos domésticos através da taxa de prenhez. O ejaculado de dois gatos adultos foi colhido com vagina artificial e o sêmen avaliado para motilidade (CASA), morfologia espermática e integridade de membrana plasmática. Após diluição em meio TRIS/OEP (4% de glicerol), as amostras foram envasadas em palhetas francesas de 0,25 mL (25×10^6 de espermatozóides móveis) as quais, após 20 minutos à 5°C, permaneceram por 15 minutos em vapor de nitrogênio líquido, sendo posteriormente mergulhadas. Para cada IA, quatro palhetas do mesmo gato foram descongeladas por 12 segundos à 46°C e centrifugadas a 250xg por 8 minutos. O *pellet* ressuspendido em 100 µL do meio foi analisado como descrito anteriormente. Nas gatas, o estro e a ovulação foram induzidos com 100 UI de eCG e, após 84 horas, 100 UI de hCG. Após 30 horas da indução da ovulação, as gatas foram inseminadas pelo método intra-uterino ou intra-vaginal, com o sêmen obtido do gato A ou B (n=8 gatas para cada método de IA). Para a análise estatística os testes de Tukey e de Wilcoxon foram utilizados para as variáveis de qualidade espermática, enquanto o teste de Fisher foi usado para comparar os métodos de IA, estabelecendo diferença significativa quando $p < 0,05$. Embora tenha sido observada uma queda acentuada de motilidade, integridade de acrossomo e integridade de membrana plasmática nas amostras seminais descongeladas de ambos os gatos, um índice de prenhez de 75% foi alcançado quando utilizado o método de IA intra-uterino, contra 0% com o método intra-vaginal.

Palavras-chave: gato doméstico, inseminação artificial, sêmen congelado, fertilidade.

ABSTRACT

VILLAVERDE, ANA IZABEL SILVA BALBIN. *Comparison between two artificial insemination methods using frozen/thawed semen in domestic cats (Felis catus)*. Botucatu, 2007. 97p. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu.

The aim of this study was to compare the efficiency of the intravaginal and the intrauterine artificial insemination methods using domestic cat frozen/thawed semen by determining the pregnancy rate. The sperm was collected from two tom cats using an artificial vagina and the samples were assessed for motility (CASA), sperm morphology and plasma membrane integrity. After dilution with TRIS/OEP (4% of glycerol), the sperm samples were loaded into 0.25 mL straws (25×10^6 of sperm cells presenting motility) which, after 20 minutes under 5°C, were placed in liquid nitrogen vapour for 15 minutes, being afterwards immersed. For each AI, four straws from the same male were thawed during 12 seconds at 46°C and centrifuged at 250xg for 8 minutes. The pellet was resuspended in 100 µL of the extender and analyzed as described above. In the queens, estrus and ovulation were induced using 100 UI of eCG and, after 84 hours, 100 UI of hCG. After 30 hours from the ovulation induction, the females were inseminated by the intrauterine or by the intravaginal methods, using the semen obtained by male A or B (n=8 females for each AI method). For statistical analysis the Tukey test and the Wilcoxon test were used for the sperm quality results, while the Fisher test was used to compare the two AI methods, with $p < 0.05$ taken as significant. Although a pronounced decrease in motility, acrosome integrity and plasma membrane integrity were observed for the sperm samples from both cats, a pregnancy rate of 75% was achieved when using the intrauterine AI method, against 0% with the intravaginal AI method.

Keywords: domestic cat, artificial insemination, frozen semen, fertility.

Introdução

INTRODUÇÃO

Os gatos domésticos (*Felis catus*), por serem animais de companhia, não apresentam a finalidade de multiplicação da população como observada em outras espécies de animais de produção. Atualmente, o controle populacional de cães e gatos através de métodos anticoncepcionais vem sendo extensivamente discutido, principalmente, nos grandes centros urbanos. Apesar desse fato, e devido a diversos fatores como; problemas comportamentais, físicos, de distância entre os reprodutores ou para um maior aproveitamento de animais com boa genética racial, as biotécnicas da reprodução vêm ocupando um papel discreto em gatis comerciais e, especialmente, de pesquisa; onde os gatos podem servir como modelo experimental para 36 anormalidades e defeitos metabólicos homólogos a doenças humanas (MIGAKI, 1982). Não obstante, devido a semelhanças fisiológicas com os demais membros da família felídea, facilidade de manejo e maior número de exemplares, o gato doméstico é um importante modelo experimental para os felinos selvagens ameaçados de extinção, especialmente, nas pesquisas ligadas às biotécnicas da reprodução.

Das 37 espécies de felídeos, com exceção apenas do gato doméstico, todas estão ameaçadas de extinção, segundo a Convenção de Tráfico Internacional de Espécies Ameaçadas (CITES 1973). Como consequência da redução do número de animais e destruição do *habitat*, os felinos selvagens ficam sujeitos ao isolamento e, assim, a diminuição da variabilidade genética que leva a redução da fertilidade, maior susceptibilidade às doenças e elevação da mortalidade infanto-juvenil (BALLOU, 1992; WILDT et al., 1995).

Os programas de conservação *in situ* e *ex situ* para algumas espécies de mamíferos ameaçadas de extinção podem ser beneficiadas com a utilização das técnicas de reprodução assistida, tais como; inseminação artificial (IA), transferência de embrião (TE), fertilização *in vitro* (FIV), micromanipulação de gametas/ embriões, sexagem espermática e clonagem. Uma das principais aplicações da IA na conservação é evitar a depressão genética causada pela fragmentação de grupos em vida livre, também podendo ser utilizada para contornar problemas físicos ou comportamentais que inviabilizem o

acasalamento e para evitar o transporte de animais para fins de acasalamento (PUKAZHENTHI & WILDT, 2004).

Na tentativa de minimizar o processo de extinção dos felinos selvagens, foi idealizado um Banco de Recursos Genéticos para o armazenamento de materiais biológicos, como gametas e embriões congelados, permitindo o transporte a qualquer distância e armazenamento por tempo indeterminado deste material (LEIBO & SONGSASEN, 2002). A utilização desse material armazenado através das biotécnicas da reprodução é importante, uma vez que, reduz o intervalo entre as gerações e permite que maiores níveis de variação genética sejam mantidos em populações pequenas (BALLOU, 1992).

Apesar das taxas de prenhez após IA utilizando sêmen fresco terem se mostrado melhor (HOWARD et al., 1992; TANAKA et al., 2000b; TSUTSUI et al., 2000ab), o sêmen congelado apresenta maior aplicabilidade para os programas de conservação de animais selvagens, pois permite a realização de um banco genético e o transporte do material por longas distâncias. Desta forma, torna-se essencial o desenvolvimento de técnicas de IA utilizando o sêmen descongelado visando melhorar sua eficiência, resultando assim em melhores taxas de prenhez.

Após o processo de congelação, evidencia-se uma queda acentuada na qualidade do sêmen felino, devido principalmente a danos causados nas membranas plasmáticas e acrossomais (PUKAZHENTHI et al., 1999; LEIBO & SONGSASEN, 2002). Quanto a utilização das gonadotrofinas exógenas, necessária para o processo de IA na maioria dos felinos, são enfrentados problemas decorrentes de fatores como; hiperestimulação ovariana (HOWARD et al., 1992; DONOGHUE et al., 1992; SWANSON et al., 1996a; GRAHAM et al., 2000) e diferenças na sensibilidade a estimulação hormonal entre as espécies de felinos (SWANSON & BROWN, 2004). Desta forma, o sucesso da inseminação artificial com sêmen congelado em felinos é um duplo desafio, pois além da notável queda na fertilidade do sêmen após descongelação, a indução hormonal ainda do estro e/ou ovulação ainda não está bem estabelecida.

Objetivo

OBJETIVO

O objetivo principal deste estudo foi comparar a eficiência de duas técnicas de inseminação artificial, intra-vaginal e intra-uterina, com sêmen congelado/descongelado em gatos domésticos, através da taxa de prenhez obtida em cada método. Também foram avaliadas:

- ❖ A eficiência do protocolo de congelação/descongelação do sêmen, estabelecido para este estudo.
- ❖ A resposta ovariana das gatas ao protocolo de indução do estro e ovulação, utilizando as gonadotrofinas exógenas.

Revisão de literatura

REVISÃO DE LITERATURA

1. Gata doméstica

1.1. Fisiologia reprodutiva

A gata doméstica é classificada como poliéstrica estacional, apresentando ciclo estral associado ao fotoperíodo positivo e, apesar da influência de diferentes latitudes e raças, o período de luz por dia tem um impacto maior no desencadeamento e duração da atividade ovariana nesta espécie (DAWSON, 1941; SHILLE et al., 1979; HURNI, 1981; LEVYA & STABENFELDT, 1983; LEVYA et al., 1989a). Nas gatas, a melatonina está envolvida na modulação do eixo hipotálamo-hipófise-ovário (LEVYA et al., 1989ab; GRAHAM et al., 2004), como em outras espécies que apresentam sazonalidade reprodutiva (PALMER et al., 1982).

O ciclo estral nas gatas apresenta duração média de 2 a 3 semanas, com uma ampla variação de 5 a 73 dias (JEMMET & EVANS, 1977), dependendo, especialmente, no desencadeamento da ovulação (PAAPE et al., 1975). Nas gatas, o ciclo estral pode ser dividido em cinco fases; pro-estro, estro, interestro, diestro (pseudogestação) e anestro.

A fase de pro-estro, observada apenas em algumas gatas, apresenta duração de 12 a 72 horas (média de 48 horas). Essa fase está associada ao aumento das concentrações séricas de estradiol, o qual é secretado pelas células da granulosa (SHILLE et al., 1979) e responsável por alterações no comportamento tais como; maior docilidade, vocalização, rolamento do corpo, fricção da cabeça contra objetos, lordose do posterior e atração do macho sem permitir o coito (FELDMAN & NELSON, 1996, JOHNSTON et al., 2001).

Após o pro-estro, a gata entra na fase de estro com duração de 2 a 19 dias, não havendo diferença neste período quando ocorre a ovulação (SHILLE et al., 1979; WILDT et al., 1981; ROOT et al., 1995). Essa fase caracteriza-se pela receptividade a monta e ocorre durante o pico de secreção do estradiol, com concentrações séricas de até 70 pg/ mL (SHILLE et al., 1979). Nessa fase, a gata apresenta acentuação dos sinais comportamentais do pro-estro,

exibindo lordose, desvio lateral da cauda, atraindo o macho e permitindo o coito (GOODROWE et al., 1989; FELDMAN & NELSON, 1996; JOHNSTON et al., 2001).

Quando a ovulação não é desencadeada, a gata passa por uma fase de interestro, que compreende o período entre um estro e o pro-estro seguinte, sendo essa exclusiva das espécies de ovulação induzida (FELDMAN & NELSON, 1996). Essa fase apresenta duração média de 8 a 15 dias e é caracterizada pela regressão dos folículos pré-ovulatórios (FPOs) e o surgimento de uma nova onda folicular (SHILLE et al., 1979; GOODROWE et al., 1989).

Nos casos em que a ovulação é desencadeada, as gatas entram na fase de diestro, caracterizada pela presença do corpo lúteo (CL). Durante o diestro, as concentrações séricas de progesterona variam de 1,5 até mais de 20 ng/ mL (SCHMIDT et al., 1983). Essa fase dura, aproximadamente, 40 dias na fêmea em pseudogestação e 60 dias na fêmea prenhe, culminando com a luteólise, quando as concentrações plasmáticas de progesterona ficam abaixo de 1,5 ng/ mL (PAAPE et al., 1975; WILDT et al., 1981; SCHMIDT et al., 1983). Após 7 a 10 dias da luteólise, uma fase de estro pode ocorrer, embora a lactação possa causar anestro com duração de até 2 a 3 semanas após o parto (WILDT et al., 1981; SCHMIDT et al., 1983).

A fase de anestro é caracterizada pela ausência de atividade ovariana, com folículos antrais superficiais de diâmetro médio de até 0,5 mm e concentrações basais de progesterona e estradiol séricos (FELDMAN & NELSON, 1996).

Nas gatas domésticas, a ovulação é desencadeada pelo estímulo mecânico do coito (CUEVA-RÓLON et al., 1994), responsável por induzir a secreção de GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas), que por sua vez promove a liberação pulsátil de LH (hormônio luteinizante) e subsequente ovulação (ROBINSON & SAWYER, 1987). A ovulação, normalmente, ocorre entre 29 a 40 horas após a estimulação, com ruptura simultânea de todos os FPOs (2,5 a 3,5 mm) presentes nos ovários (CONCANNON et al., 1980; WILDT et al., 1981; SHILLE et al., 1983). A magnitude do pico de LH depende do número de cópulas, uma vez que apenas metade das fêmeas, após uma única cópula, mostrou-se capaz de produzir uma quantidade adequada de LH

para induzir a ovulação (CONCANNON et al., 1980; WILDT et al., 1980). Banks & Stabenfeldt (1982) observaram que a habilidade da gata para liberar o LH em resposta ao coito é dependente do tempo de exposição do hipotálamo e/ou hipófise anterior ao estrógeno.

Apesar das gatas serem classificadas como animais de ovulação induzida, foi observado que quando mantidas em grupo, as fêmeas podem ovular mesmo na ausência do coito ou estímulo similar [35% (LAWLER et al., 1993) e 67% (GUDERMUTH et al., 1997; GRAHAM et al., 2000)]. Esse fato indica que estímulos visuais ou olfatórios (feromônios) podem estar envolvidos no desencadeamento da ovulação em gatas domésticas (GUDERMUTH et al., 1997).

1.2. Indução do estro e ovulação

A manipulação do estro e ovulação nos felinos é importante pois permite maior aproveitamento de fêmeas em anestro, com ciclos irregulares ou de difícil detecção do cio natural, como no caso dos felinos selvagens. Os protocolos de indução também são essenciais para a aplicação de biotécnicas como; IA, TE, FIV, entre outras. Por exemplo, devido à ausência do coito na técnica de IA, estímulos mecânicos ou hormonais são necessários para desencadear a ovulação (SOJKA et al., 1970; PLATZ et al., 1978; HOWARD et al., 1992; TSUTSUI et al., 2000ab).

Em gatas domésticas, o desenvolvimento folicular pode ser estimulado através da utilização de hormônios exógenos como o FSH (hormônio folículo estimulante) (PLATZ et al., 1978; WILDT et al., 1978; DRESSER et al., 1987; TSUTSUI et al., 1989; POPE et al., 1993; VERSTEGEN et al., 1993) ou eCG (gonadotrofina coriônica eqüina) (CLINE et al., 1980; GOODROWE et al., 1988a; HOWARD et al., 1992; SWANSON et al., 1997; POPE et al., 2006) e a maturação final dos folículos e ovulação podem ser induzidos com a aplicação de GnRH (CHAKRABORTY et al., 1979; GOODROWE & WILDT, 1987; SWANSON & GODKE, 1994), hCG (gonadotrofina coriônica humana) (SOJKA et al., 1970; PLATZ et al., 1978; WILDT et al., 1978; HOWARD et al., 1992; TANAKA et al., 2000b; TSUTSUI et al., 2000ab) ou LH (POPE et al., 2006). Existem vários protocolos utilizando esses hormônios em diferentes doses e

freqüências de aplicação. A indução da ovulação também pode ser realizada através de estimulação mecânica da vagina com um *swab* de algodão, uma haste de vidro (FELDMAN & NELSON, 1996) ou com um macho vasectomizado (PLATZ et al., 1978).

Doses diárias de 2 mg de FSH, durante cinco a sete dias, demonstraram resultados satisfatórios de comportamento estral e de desenvolvimento folicular e alta porcentagem de fertilidade (71,4%) após monta natural (WILDT et al., 1978). Em contra partida, Tsutsui et al (1989) utilizando doses diárias de FSH menores (1 mg) obtiveram baixos índices de fertilidade (38,6%) após monta natural. Dresser et al. (1987) encontraram melhores resultados na resposta ovariana e recuperação de embrião após a utilização de FSH em doses diárias de 0,75 a 1 mg por cinco dias e 0,25 mg no sexto dia.

A utilização do eCG em dose única (100 UI) nas gatas em anestro, seguido de uma injeção de hCG (50 UI) após cinco a sete dias, levou a resultados de ovulação e de prenhez comparáveis à monta natural (CLINE et al., 1980). O eCG, quando utilizado para o protocolo de IA na dose de 100 UI, resultou em alta porcentagem de gatas com atividade folicular (53 de 54, 98,1%) (HOWARD et al., 1992)

Takaya (1989), comparando a utilização de FSH e eCG na estimulação da atividade ovariana, observou maior número de ovulações e melhor taxa de recuperação embrionária após o uso de eCG. Adicionalmente, o eCG, por permanecer mais tempo na circulação (120 horas - SWANSON et al., 1997), é administrado em dose única, ao contrário do FSH que necessita de múltiplas injeções (meia vida de 48 a 93 minutos - WILDT et al., 1978). Por essa razão, a utilização do eCG é mais conveniente quando se trabalha com felinos selvagens, uma vez que diminui o estresse causado pelo manejo excessivo.

O hCG desencadeia a ovulação em gatas após 26 a 29 horas de sua aplicação (SOJKA et al., 1970; SHILLE et al., 1983). Recentemente, foi observado que mais de 40% das fêmeas em cio natural apresentaram ovulação após 15 a 20 horas do hCG (TSUTSUI et al., 2000a), sugerindo tanto a existência de grande variação entre os tempos de ovulação quanto a ocorrência de ovulação espontânea, uma vez que essas fêmeas foram mantidas em colônias (LAWLER et al., 1993; GUDERMUTH et al., 1997).

Após utilização de eCG para indução do estro, o hCG deve ser administrado dentro de 80 a 88 horas, pois a qualidade dos oócitos e as taxas de clivagem *in vitro* podem ser comprometidas após intervalos menores ou maiores (GOODROWE et al., 1988b; DONOGHUE et al., 1992).

Tanaka et al. (2000b), trabalhando com gatas do segundo ao quarto dia do estro natural, obtiveram 100% de ovulações com 100 UI de hCG em duas doses com intervalo de 24 horas e de 91,7% com 250 UI de hCG em dose única. Howard et al. (1992) não encontraram diferenças na porcentagem de ovulações, no número de CLs detectados no momento da IA, na taxa de prenhez e nem no número e qualidade de embriões recuperados após seis dias quando utilizaram 75 ou 100 UI de hCG em dose única. Em adição, a utilização de 25 µg do GnRH em dose única resultou em 100% de gatas com ovulação de todos os folículos presentes (CHAKRABORTY et al., 1979).

Apesar das gatas responderem bem aos tratamentos hormonais, apresentando crescimento folicular, comportamento estral e ovulação, foram observadas baixas taxas de fertilidade *in vitro* (GOODROWE et al., 1988b) e *in vivo* (TSUTSUI et al., 1989) e um número reduzido de filhotes nascidos por ninhada (GOODROWE et al., 1988b; HOWARD et al., 1992).

Nas gatas domésticas, após tratamento com eCG e hCG, foram observados múltiplos folículos ancilários (SWANSON et al., 1996a; GRAHAM et al., 2000) e CLs acessórios (GOODROWE et al., 1988b; HOWARD et al., 1992) presentes nos ovários após seis a sete dias da aspiração folicular ou IA. O desenvolvimento de novos folículos vários dias após a ovulação também foi observado em protocolos com FSH e hCG (WILDT et al., 1978). Esses folículos ancilários são responsáveis por alterações hormonais como elevação tardia e mais prolongada do estrógeno (CHAN et al., 1982; GRAHAM et al., 2000). Aparentemente, essas alterações hormonais não influenciam a qualidade ou o estágio de desenvolvimento embrionários, embora os níveis elevados de estrógeno possam afetar o transporte embrionário através do oviduto (GRAHAM et al., 2000). Atraso semelhante no transporte embrionário através do oviduto foi observado por Herron & Sis (1974) após administração exógena de estradiol em gatas.

Roth et al. (1997) relataram uma produção de embriões de boa qualidade, com metade dos embriões na fase de blastocisto, em gatas tratadas

com eCG e monta natural. Adicionalmente, a utilização de soro neutralizante anti-eCG em gatas, após tratamento com eCG e hCG, não foi efetiva na prevenção da formação de folículos ancilários e de CLs secundários (SWANSON et al., 1996a). Mais adiante, uma vez provada a capacidade foliculogênica e permanência prolongada na circulação (96 horas) (SWANSON et al., 1997), o hCG foi implicado no desenvolvimento dessas estruturas ovarianas secundárias. Embora o eCG, quando administrado antes do hCG, possa estimular um crescimento folicular adicional e potencializar a resposta dos folículos antrais jovens às atividades foliculogênica e luteotrófica intrínsecas do hCG (SWANSON et al., 1997).

Atualmente nas gatas domésticas, a inibição da atividade ovariana tem sido utilizada previamente a aplicação de protocolos de indução do estro com gonadotrofinas exógenas, visando obter uma resposta mais previsível e uniforme. Hormônios como os progestágenos (levonorgestrel) (PELICAN et al., 2000), a melatonina (GRAHAM et al., 2004) e os antagonistas do GnRH (PELICAN et al., 2000) já foram testados em gatas domésticas. Quando os progestágenos foram utilizados anteriormente à indução do estro, foram observados um número maior de embriões após a FIV (PELICAN et al., 2001) e uma resposta ovariana mais consistente para a técnica de IA, com ovulações previsíveis (PELICAN et al., 2004).

Gatas estimuladas repetidamente usando eCG e hCG, com intervalos de 45 a 50 dias, apresentaram uma redução no desenvolvimento folicular e na maturidade dos oócitos recuperados a partir do terceiro tratamento (SWANSON et al., 1995). Esse achado foi atribuído a uma produção de imunoglobulinas ligadoras de gonadotrofinas pelo sistema imune (SWANSON et al., 1995). A mesma alteração na resposta ovariana pode ser observada depois de repetidos tratamentos com FSH (POPE et al., 2000). Assim, para a redução da resposta imune, intervalos de no mínimo quatro meses entre os sucessivos tratamentos são recomendados (SWANSON et al., 1996b). Alternar os tratamentos com FSH e eCG, embora tenha dado bons resultados (POPE et al., 1994), fêmeas refratárias ao eCG e tratadas com FSH apresentaram melhora no desenvolvimento dos folículos ovarianos, mas não na maturidade dos oócitos (SWANSON et al., 1995).

1.3. Inseminação artificial

A técnica de IA pode ser benéfica para: 1) indivíduos que falham no cruzamento devido à incompatibilidade sexual, a dificuldades físicas ou médicas; 2) aumentar a diversidade genética dentro de uma população e expandir o *pool* genético através de cruzamentos com indivíduos selecionados e; 3) distribuição segura do sêmen entre diferentes localizações geográficas, sem o risco e custo de transportar os animais.

Em gatos domésticos, a primeira prenhez após IA foi obtida em 1970 por Sojka et al., que utilizaram sêmen fresco e inseminação artificial intra-vaginal (IAIV). Após seis anos, Platz et al. reportaram o nascimento de filhotes utilizando sêmen congelado e IAIV. Em 1992, foi realizada a primeira inseminação artificial intra-uterina (IAIU) (HOWARD et al., 1992). Até o momento, existem poucos estudos a respeito da técnica de IA em gatos domésticos. Um resumo desses trabalhos se encontra no Quadro 1.

QUADRO 1. Taxas de prenhez em gatas domésticas utilizando as técnicas de inseminação artificial intra-vaginal, intra-uterina e na tuba uterina com sêmen congelado ou fresco.

Local de inseminação	Sêmen	Dose inseminante (10 ⁶)	Volume inseminante (μL)	Estro	Momento da IA após hCG (horas)	Taxa de prenhez (%)	Referência
Intra-vaginal	Fresco (ejaculado)	1,25 a 50	100	Natural	24 a 41	50	Sojka et al., 1970
Intra-vaginal	Fresco (ejaculado)	5	100	Natural	0 e 24	75	Sojka et al., 1970
Intra-vaginal	Fresco (ejaculado)	80	50 a 100	Natural	15 a 30	77,8	Tanaka et al., 2000a
Intra-vaginal	Congelado (ejaculado)	50 a 100	100	Natural ou Induzido (FSH)	24 e 48	10,6	Platz et al., 1978
Intra-uterino Bilateral	Fresco (ejaculado)	6,6	200	Induzido (eCG)	25 a 33 (Pré ovulação)	14,3	Howard et al., 1992
Intra-uterino Bilateral	Fresco (ejaculado)	6,6	200	Induzido (eCG)	31 a 50 (Após ovulação)	50	Howard et al., 1992
Intra-uterino Unilateral	Fresco (ejaculado)	8	30	Natural	15 a 30	80	Tsutsui et al., 2000a
Intra-uterino Unilateral	Congelado (ejaculado)	50	30	Natural	15 a 20	57,1	Tsutsui et al., 2000b
Intra-uterino Unilateral	Congelado (epidídimo)	50	40	Natural	20	27,3	Tsutsui et al., 2003
Tuba-uterina Bilateral	Fresco (ejaculado)	4	10 a 20	Natural	15 a 20	42,9	Tsutsui et al., 2001

O local de deposição do sêmen na monta natural ou na IA determina as barreiras anatômicas que os espermatozóides terão que transpor durante o seu trânsito até o local de fertilização. Nos gatos domésticos, ainda não foi determinado o exato local de deposição do sêmen após a monta natural. Devido a características anatômicas como; tamanho do pênis ereto do gato (comprimento de 21,2 +/- 2,2 mm e largura de 5,1 +/- 0,5 mm), profundidade da vagina na gata (45 a 50 mm) e lúmen de apenas 1 mm na vagina anterior, a qual é constituída de tecido não flexível, acredita-se que o sêmen seja depositado de 15 a 20 mm caudal a cérvix, na vagina posterior (WATSON & GLOVER, 1993; SWANSON & GODKE, 1994).

Para a técnica de IA, nos gatos domésticos o sêmen pode ser depositado no fundo de vagina (SOJKA et al., 1970; PLATZ et al., 1978; TANAKA et al., 2000b), no útero (HOWARD et al., 1992; TSUTSUI et al., 2000ab; TSUTSUI et al., 2003) ou até mesmo na tuba-uterina (TSUTSUI et al., 2001). O local de deposição do sêmen tem grande influência sobre o sucesso na obtenção de prenhez após a IA, principalmente, quando se trabalha com sêmen congelado/descongelado, uma vez que o tempo de sobrevivência destes espermatozóides é, significativamente, menor quando comparado ao sêmen fresco. A utilização da técnica de IAIU com sêmen descongelado nas gatas, depositando o espermatozóide próximo ao local de fertilização, aumentou a taxa de concepção de 10,6% (PLATZ et al., 1978) para 57% (TSUTSUI et al., 2000b). Outra vantagem da deposição do sêmen diretamente no útero é a necessidade de uma menor quantidade de espermatozóides comparada a IAIV (PLATZ et al., 1978; TANAKA et al., 2000b; TSUTSUI et al., 2000ab).

Durante a realização da IAIV, a sonda de inseminação deve ser posicionada o mais próximo possível da abertura cervical. Observou-se que o cateter uretral rígido para gatos, com diâmetro de 1 mm, é fino o suficiente para ultrapassar a vagina anterior e chegar até a cérvix (CHATDARONG et al., 2002). Chatdarong et al (2002), através da deposição de meio de contraste no fundo de vagina, verificaram que o posicionamento da gata em decúbito dorsal com o posterior elevado em 30° facilita a infusão do contraste da vagina para o interior do útero.

Existem várias técnicas de IAIU como a laparotomia (TSUTSUI et al., 2000ab; TSUTSUI et al., 2003), a laparoscopia (HOWARD et al., 1992) e também a técnica de cateterização trans-cervical (ZAMBELLI & CUNTO, 2005). A inseminação artificial trans-cervical, além de não necessitar de cirurgia, apresenta as mesmas vantagens das demais técnicas de IAIU. Vários modelos de sondas foram propostos para a técnica trans-cervical (HURLBUT et al., 1988; SWANSON & GODKE, 1994; CHATDARONG et al., 2001; ZAMBELLI & CASTAGNETTI, 2001), contudo, devido a variações anatômicas entre as gatas, o sucesso na passagem da sonda pela cérvix é extremamente variável [70,6% (HURLBUT et al., 1988), 87,5% (SWANSON & GODKE, 1994), 76,5% (CHATDARONG et al., 2001) e 50% (ZAMBELLI & CASTAGNETTI, 2001)], sendo esta uma desvantagem importante na utilização da técnica de inseminação trans-cervical. Zambelli et al. (2004) também observaram que existe diferença nas taxas de sucesso na cateterização trans-cervical entre gatas com estro espontâneo (22%) e gatas com estro induzido durante o anestro (80%).

Normalmente, a ovulação é desencadeada após 26 a 29 horas de sua indução com hormônios ou com gatos vasectomizados (SOJKA et al., 1970; SHILLE et al., 1983). Desta forma, o sêmen do gato deve ter duração de no mínimo 26 a 29 horas, uma vez que a ovulação é induzida pelo coito e que a prenhez pode ser originada após uma única cópula. Sojka et al. (1970) demonstraram que a IA ou a monta natural podem resultar em prenhez quando realizadas até 49 horas após a indução da ovulação. A cérvix da gata demonstrou permanecer aberta apenas do meio ao final do estro, com pequena variação individual (CHATDARONG et al., 2002). Assim, a IA deve ser realizada durante o meio ou final do estro e dentro de 49 horas após a indução da ovulação.

Geralmente, é utilizada apenas uma única IA, principalmente quando esta envolve anestesia e cirurgia. Entretanto, foi demonstrado que a realização de duas inseminações com 24 horas de intervalo pode aumentar a taxa de concepção em 50% quando utilizando a IAIV com sêmen fresco (SOJKA et al., 1970). Tanaka et al. (2000b), trabalhando com sêmen fresco, não observaram diferença entre as taxas de concepção após IAIV com 15, 20 ou 30 horas da

aplicação do hCG, apesar do pequeno número de animais utilizados em cada grupo.

A sedação das gatas é indispensável para a realização da IAIU, uma vez que esta requer um ato cirúrgico. Já para a IAIV, embora a sedação não seja essencial, esta facilita o posicionamento da sonda de inseminação e evita a ocorrência da reação pós-coito, a qual é resultante da estimulação intra-vaginal induzida pela sonda. Howard et al. (1992) observaram que a anestesia pode comprometer o processo de ovulação quando a sedação é realizada previamente ao desencadeamento da mesma, aumentando o número de folículos não ovulados e, conseqüentemente, reduzindo a quantidade de CLs formados. Nesse estudo, a taxa de concepção anteriormente a ovulação foi menor (14%) quando comparada à taxa obtida com IA após a ovulação (50%) (HOWARD et al., 1992). Em contrapartida, Tsutsui et al (2000a) utilizando o mesmo protocolo de anestesia não observaram interferência da sedação sobre a indução da ovulação e melhores resultados de prenhez foram obtidos após IA previamente à ovulação. Entretanto, Tsutsui et al. (2000a) utilizaram uma dose de hCG maior quando comparada a dose usado por Howard et al. (1992) para induzir a ovulação.

Sojka et al. (1970) observaram que utilizando uma dose inseminante de 5 a 50×10^6 de espermatozoides, taxas de prenhez entre 40 a 67% foram alcançadas após IUIV com sêmen fresco. Por sua vez, Tanaka et al. (2000b), utilizando diferentes quantidades de espermatozoides para a IAIV com sêmen fresco, observaram que o melhor resultado foi obtido com 80×10^6 de espermatozoides (80%). Para a IAIU com sêmen fresco, a quantidade necessária de espermatozoides para alcançar um índice de 77,8% de prenhez é dez vezes menor quando comparada à IUIV, sendo de apenas 8×10^6 de espermatozoides (TSUTSUI et al., 2000a). Já para o sêmen congelado, uma quantidade de 50×10^6 de espermatozoides depositados diretamente no útero resultou em apenas 57% de prenhez (TSUTSUI et al., 2000b).

2. Gato doméstico

2.1. Fisiologia reprodutiva

Nos gatos domésticos a atividade mitótica nos túbulos seminíferos é evidenciada quando os testículos atingem um peso entre 400 a 500 mg, com aproximadamente 20 semanas de idade (SCOTT & SCOTT, 1957). A puberdade nos machos varia com a condição física, peso e época do ano, ocorrendo entre 8 a 10 meses de idade ou quando o animal atinge 2,5 Kg (GOODROWE et al., 1989). A glândula do pênis nos gatos adultos e não castrados apresenta de 100 a 200 papilas cornificadas, detectadas aos 6 a 7 meses de idade, sendo estas andrógeno dependentes (STABENFELDT & SHILLE, 1977). Gatos mantidos sob iluminação controlada (12 horas de luz por dia) não demonstram comportamento de sazonalidade (BEAVER, 1977).

As concentrações séricas de testosterona no gato adulto intacto variam entre o não detectado (0,07 nmol/L) até 81,5 nmol/L (JOHNSTON et al., 1996). A secreção de testosterona nessa espécie é pulsátil, sem ritmo diurno (JOHNSTONE et al., 1984; TSUTSUI et al., 1990). Resultados conflitantes sugerem a presença (JOHNSTONE et al., 1984) ou ausência (KIRKPATRICK, 1985; TSUTSUI et al., 1990) de um efeito sazonal nas concentrações circulantes de testosterona no gato.

2.2. Colheita e características do sêmen

O sêmen nos felinos pode ser colhido através de métodos como; vagina artificial, eletroejaculação, lavagem da vagina pós-coito, cistocentese após ejaculação e recuperação de espermatozóides epididimais após orquiectomia ou *post-mortem* (JOHNSTON et al., 2001).

A colheita utilizando o eletroejaculador é o método de eleição para os felinos selvagens e para a maioria dos gatos domésticos, uma vez que o animal deve ser anestesiado e não há necessidade de treinamento prévio (HOWARD, 1993). O aparelho de eletroejaculação, utilizado para os gatos domésticos, consiste em um aplicador de corrente elétrica alternada (70 Hz) com controle de voltagem (1 a 12 V) e probe (1 cm de diâmetro por 13 cm de comprimento) contendo três eletrodos (1,5 mm por 5 cm) de cobre no terço proximal (PLATZ & SEAGER, 1978). O protocolo de estímulos elétricos

proposto por Howard et al. (1990) é o mais utilizado atualmente para os gatos domésticos (Tabela 1).

TABELA 1. Número de estímulos e intensidade (V) em cada série de eletroejaculação.

	1ª Série			2ª Série			3ª Série	
Número de estímulos	10	10	10	10	10	10	10	10
Intensidade (V)	2	3	4	3	4	5	4	5

Em 1986, Dooley & Pineda trabalhando com colheitas semanais e quatro eletroejaculações por colheita, verificaram que a osmolalidade, o volume e a quantidade de espermatozóides num ejaculado são afetados pelo gato e pela voltagem utilizada, com maior quantidade de espermatozóides em voltagens mais altas (4 a 8 V), e que o pH varia entre os animais e semana de colheita. A contaminação por urina pode ocorrer quando altas voltagens (acima de 8 V) são aplicadas ou quando a probe e eletrodos estão posicionados cranialmente ao local ideal (HOWARD, 1993). Essa contaminação causa rápida e irreversível perda de motilidade dos espermatozóides (GOODROWE et al., 1989).

Para a utilização da vagina artificial na colheita de sêmen de gatos, é necessário um período de treinamento (2 a 3 semanas), o qual apenas 60 a 70% dos animais respondem (SOJKA et al., 1970). Outra desvantagem dessa técnica é a necessidade, na maioria dos casos, de uma fêmea no cio para a realização da colheita. Esse método de colheita apresenta grande aplicabilidade em animais pertencentes a colônias de pesquisa, quando são necessárias várias colheitas.

Ejaculados colhidos pelo método de eletroejaculação apresentam volume e pH maiores quando comparados com ejaculados colhidos através de uma vagina artificial (PLATZ et al., 1978; DOOLEY & PINEDA, 1986), provavelmente, devido a grande estimulação das glândulas sexuais acessórias (PLATZ & SEAGER, 1978), principalmente da próstata, cujo fluido é alcalino (7,8 +/- 0,6) (JOHNSTON et al., 1988). Platz et al. (1978) encontraram um efeito significativo do método de colheita sobre a motilidade espermática, com

menores valores obtidos quando utilizaram a eletroejaculação, entretanto, Dooley & Pineda (1986) não observaram este efeito.

Colheitas realizadas em dias alternados demonstraram não alterar a qualidade e quantidade dos espermatozóides ejaculados em gatos domésticos (SOJKA et al., 1970; TANAKA et al., 2000a). Em contrapartida, colheitas diárias causaram uma redução de mais de 50% no número de espermatozóides após o quarto dia de colheita (SOJKA et al., 1970). Quando se realizam duas colheitas consecutivas, com intervalos de 5 a 10 minutos, observa-se que o segundo ejaculado apresenta menor número de espermatozóides quando comparado ao primeiro, mesmo quando a colheita é realizada a cada três dias (TANAKA et al., 2000a).

As anormalidades espermáticas mais freqüentes em amostras seminais de gatos domésticos são; macrocefalia, microcefalia, formas duplas, cauda fortemente enrolada ou dobrada, peça intermediária dobrada, gota citoplasmática proximal ou distal e cabeça isolada (JOHNSTON et al., 2001). Axnèr et al. (1999) observaram que, nos espermatozóides dos gatos, as anormalidades de cabeça, acrossomo e peça intermediária se originam nos testículos, enquanto que as anormalidades de cauda são originadas nos epidídimos ou quando o espermatozóide entra em contato com o fluído seminal.

Alguns gatos domésticos e muitas espécies de felídeos selvagens apresentam altas proporções de espermatozóides anormais em seus ejaculados, sendo classificados como teratospérmicos quando mais de 60% dos espermatozóides são anormais ou normospérmicos quando esta porcentagem é menor que 40% (HOWARD et al., 1990, WILDT, 1994). Howard et al. (1990), comparando estas duas populações, demonstraram que os níveis de testosterona sérica são 33% menores nos gatos teratospérmicos. Os animais teratospérmicos também apresentam características como; 1) maior susceptibilidade da membrana plasmática aos danos induzidos pela refrigeração, 2) maior sensibilidade ao estresse osmótico, 3) menor estabilidade do DNA, 4) menor capacidade de fertilização após a injeção espermática intra-citoplasmática e 5) maior período para capacitação espermática e reação acrossomal *in vitro* (PUKAZHENTHI et al., 2001).

Em gatos domésticos, foi observado que amostras de sêmen com alta proporção de anormalidades apresentam valores de motilidade menores (STACHECKI et al., 1993). Estudos realizados em humanos e animais têm correlacionado a motilidade e a morfologia à capacidade de fertilização (KRUGER et al., 1988; DONNELLY et al., 1998; FARRELL et al., 1998; LARSEN et al., 2000). Correlação entre a porcentagem de formas anormais e o sucesso na fertilização *in vitro* também foi encontrada em gatos (HOWARD et al., 1990).

2.3. Criopreservação do sêmen

Quando exposto às temperaturas de 37° ou 23°C, o sêmen do gato *in natura* mantém sua motilidade por 60 a 140 minutos, respectivamente, podendo este período ser prolongado quando se utiliza um meio diluidor (GOODROWE et al., 1989). Assim, para a preservação do sêmen por longos períodos podem ser utilizados os métodos de refrigeração ou congelação. A refrigeração, que consiste na manutenção do sêmen entre 4 a 5°C, permite uma estocagem a curto prazo: overnight (GOODROWE & HAY, 1993), por 24 horas (GLOVER & WATSON, 1985; POPE et al., 1989, POPE et al., 1991b), por 72 horas (TITTARELI et al., 2006; VILLAVARDE et al., 2006), ou algumas vezes por mais de 5 a 7 dias (GLOVER & WATSON, 1985; HARRIS et al., 2001). Por sua vez, o método de congelação em nitrogênio líquido, por permitir o armazenamento por tempo indeterminado, apresenta grande potencial para a conservação, possibilitando a criação de um banco de recursos genéticos para os animais selvagens.

Nos felinos, as primeiras tentativas para prolongar a viabilidade espermática foram realizadas no sêmen de gato doméstico (PLATZ et al., 1978). Desde então, vários protocolos para a congelação do sêmen têm sido utilizados para os espermatozóides do ejaculado (WOOD et al., 1993; STACHECKI et al., 1995; TSUTSUI et al., 2000b; ZAMBELLI et al., 2002; BARAN et al., 2004) ou do epidídimo (HAY & GOODROWE, 1993, LENGWINAT & BLOTTNER, 1994; STACHECKI et al., 1994; NELSON et al., 1999; SCHÄFER & HOLZMANN, 2000; LUVONI et al., 2002; TSUTSUI et al., 2003; AXNÈR et al., 2004; KASHIWAZAKI et al., 2005) dos gatos domésticos.

O conhecimento da resposta das células espermáticas felinas às várias condições estressantes da criopreservação é necessário para a formulação de protocolos de congelamento mais apropriados. Adicionalmente, determinar força de centrifugação, taxas de refrigeração e de congelamento, concentrações de crioprotetores, tipos de diluentes e técnicas de armazenamento que sejam mais apropriados para o sêmen dos felinos, também é importante para o sucesso na preservação dessas células.

Durante o processo de criopreservação a célula espermática é exposta a inúmeros fatores estressantes como; choque térmico durante o resfriamento do sêmen, formação de cristais de gelo intracelulares, choque osmótico durante a congelamento e descongelamento e estresse ligado à adição e à ação do crioprotetor (WATSON, 2000). Os danos causados às células pelo choque térmico, observados como uma perda irreversível da motilidade após descongelamento, incluem lesões nas membranas e alterações na função metabólica, provavelmente, ocasionados por mudanças no arranjo dos constituintes das membranas do espermatozóide (PARKS, 1997). Os efeitos do choque térmico em funções celulares, como na perda da permeabilidade seletiva da membrana plasmática, podem ser observados através de colorações intracelulares com corantes não permeáveis à membrana plasmática intacta (MEDEIROS et al., 2002). Na análise ultraestrutural, o choque térmico é manifestado mais claramente por uma ruptura das membranas acrossomais (MEDEIROS et al., 2002).

A ocorrência do choque térmico pode ser prevenida pelo controle da taxa de refrigeração e adição de componentes protetores ao diluente, como gema de ovo ou leite (PARKS, 1997). O mecanismo de proteção da gema de ovo parece estar relacionado aos fosfolípidos e lipoproteínas de baixa densidade (LBD) em sua composição, enquanto que o mecanismo do leite desnatado parece residir na fração protéica (PARKS, 1997). Os fosfolípidos da gema de ovo são capazes de reduzir as injúrias do resfriamento sobre o espermatozóide, sem alterar a composição intrínseca da membrana e/ou propriedades fisiológicas (PARKS, 1997). Os mecanismos exatos pelos quais os componentes da gema de ovo e do leite protegem as membranas não estão bem esclarecidos.

Glover & Watson (1987), avaliando os efeitos de diferentes concentrações da gema de ovo (2 a 20%) e da fração de LBD da gema de ovo (2 a 20%), observaram que a proteção dada pela maior concentração de LBD (20%) não foi maior quando comparada à menor concentração da gema de ovo (2%) e que, após longa estocagem do sêmen à 5°C, não houve melhora da motilidade e viabilidade dos espermatozóides com o uso desses compostos. Entretanto, estudos posteriores relataram melhores resultados de motilidade, vigor e viabilidade em amostras de sêmen estocadas à 5°C por vários dias quando na presença de gema de ovo (PUKAZHENTHI et al., 1999; HARRIS et al., 2001).

Nos gatos domésticos, taxas mais lentas de refrigeração (0,2 a 0,5°C/min) têm sido propostas para minimizar os danos causados às membranas plasmáticas e acrossomais (POPE et al., 1989; PUKAZHENTHI et al., 1999). Zambelli et al. (2002), após testarem cinco taxas para congelação, observaram que a menor taxa utilizada (3,85°C/min) proporcionou os melhores resultados de motilidade e porcentagem de acrossomos normais. Pope et al. (1991b), usando uma taxa de congelação de 10°C/min, obtiveram resultados de motilidade e porcentagem de acrossomos normais semelhantes à taxa de 9°C/min testada por Zambelli et al. (2002).

O primeiro protocolo para a congelação do sêmen do gato preconizava a utilização de *pellets* (PLATZ et al., 1978). Opiniões sobre o melhor método para congelação do sêmen felino são discordantes. Após comparação entre palhetas e *pellets*, Pope et al. (1991b) encontraram melhores resultados quando utilizaram as palhetas, enquanto Wood et al. (1993) não encontraram diferença entre os dois métodos. Vale ressaltar que estes dois trabalhos utilizaram métodos diferentes de congelação. Apesar das divergências existentes, as palhetas têm sido utilizadas extensivamente em protocolos de congelação para o sêmen de gatos devido, provavelmente, a sua maior praticidade.

As células espermáticas dos felinos são muito sensíveis às diferenças de osmolalidade, sendo as soluções hipotônicas mais prejudiciais, com inchaço e ruptura da membrana plasmática, quando comparadas às soluções hipertônicas, que causam encolhimento das células (PUKAZHENTHI et al., 2000; PUKAZHENTHI et al., 2002). Os espermatozóides provenientes de

machos teratospérmicos são mais vulneráveis ao estresse hipotônico, sendo a motilidade espermática mais sensível às alterações de osmolalidade quando comparada à integridade da membrana plasmática (PUKAZHENTHI et al., 2000; PUKAZHENTHI et al., 2002). A osmolalidade do sêmen do gato varia entre 290 a 320 mOsm/ Kg, portanto melhores resultados de motilidade espermática são obtidas quando se utiliza meio diluidor com osmolalidade nesta faixa (292 a 325 mOsm/ Kg) (GLOVER & WATSON, 1985).

McLaughling & Hamner (1974) demonstraram que a presença do plasma seminal afeta negativamente a habilidade de fertilização do espermatozóide do gato doméstico, uma vez que a centrifugação em baixa velocidade (250 xg) e remoção do plasma seminal prolongou o tempo de sobrevivência dos espermatozóides. Em contrapartida, Harris et al. (2001), após remoção do plasma seminal, não observaram melhora na motilidade, viabilidade e, tampouco, no *status* acrossomal no sêmen do gato doméstico.

A adição dos agentes crioprotetores ao meio diluidor é essencial para a sobrevivência das células espermáticas, uma vez que minimiza os efeitos do processo de congelação/descongelação por promover alterações das propriedades físicas da solução (HOLTZ, 2000b). Contudo, essas substâncias podem causar danos às células (PARKS & GRAHAM, 1992; WATSON, 1995). Os agentes crioprotetores podem penetrar ou não a membrana plasmática, dependendo de seu peso molecular (HOLTZ, 2000b).

O glicerol, um crioprotetor penetrante, é o mais utilizado no meio diluidor para a congelação do sêmen de gatos domésticos podendo ser encontrado em diferentes concentrações; 3% (HAY & GOODROWE, 1993; KASHIWAZAKI et al., 2005), 4% (PLATZ et al., 1978; NELSON et al., 1999; ZAMBELLI et al., 2002; BARAN et al., 2004), 5% (POPE et al., 1991b; AXNÈR et al., 2002) ou 7% (TSUTSUI et al., 2000b; TSUTSUI et al., 2003; TEBET et al., 2006). O DMSO (dimetilsulfóxido), um crioprotetor também penetrante, utilizado na concentração de 4%, resultou em valores de motilidade espermática e de taxa de FIV semelhantes quando comparado ao glicerol a 4% para a congelação do sêmen de gato (NELSON et al., 1999).

Os efeitos colaterais do glicerol são dependentes da tolerância espécie-específica do espermatozóide ao crioprotetor. As células espermáticas de algumas espécies, como os camundongos, não toleram o glicerol, enquanto

outras, como os marsupiais, necessitam de aproximadamente 20% de glicerol no diluente para que este exerça alguma função protetora durante a congelação (HOLTZ, 2000a). Para os gatos domésticos, TEBET et al. (2006), utilizando taxas rápidas de congelação e 7% de glicerol, obtiveram média de motilidade espermática de 62%, semelhante à média encontrada por Zambelli et al. (2002) utilizando 4% de glicerol e taxas de congelação mais lentas. Quando taxas de 3 ou 4% de glicerol foram comparadas, diferenças na motilidade espermática e na porcentagem de células morfolologicamente normais não foram encontradas (BARAN et al., 2004). Adicionalmente, Nelson et al. (1999) observaram que concentrações acima de 8% de glicerol ou DMSO tiveram efeito nocivo às células espermáticas dos gatos domésticos.

Os catabólicos produzidos pelo metabolismo espermático acarretam em uma drástica redução do pH pelo acúmulo de ácidos lácticos no meio extracelular, podendo este ambiente causar a morte dos espermatozóides (HOLTZ, 2000b). Desta forma, torna-se importante a adição de tampões ao meio diluidor para a manutenção do balanço iônico e do pH (HOLTZ, 2000b). Substâncias com poder tampão, como o citrato de sódio, TRIS (trishidroximetilaminometano) ou TES (ácido N-trishidroximetil-metil-2-aminometano-sulfônico) têm sido utilizados com sucesso em diluidores para a preservação de gametas felinos (POPE et al., 1991b; HAY & GOODROWE et al., 1993; TSUTSUI et al., 2000b; HARRIS et al., 2001; ZAMBELLI et al., 2002; TEBET et al., 2006).

Acredita-se que os detergentes a base de SDS (lauril sulfato de sódio), como Equex STM Paste® e Orvus ES Paste® (OEP), dissolvam as lipoproteínas da gema de ovo, aumentando o potencial de penetração das mesmas na membrana plasmática e, por conseqüência, aumentando a sua ação protetora (HOLTZ, 2000a). Esses detergentes também são conhecidos por apresentar um efeito tóxico às membranas espermáticas (ARRIOLA & FOOTE, 1987). A adição de Equex STM Paste® ao meio diluidor, utilizado para a criopreservação do sêmen de gato proveniente do epidídimo, aumentou a porcentagem de acrossomos intactos após a descongelação, embora tenha reduzido a longevidade dessas células quando incubadas *in vitro* (AXNÈR et al., 2004). A suplementação com 1% de OEP no meio diluidor, embora em um número pequeno de animais, mostrou melhorar a qualidade dos

espermatozóides epididimais do gato após descongelação (TSUTSUI et al., 2003).

A peroxidação dos lipídios, observada nos processos de refrigeração e congelação, pode induzir danos diretos ou mudanças na estrutura e fluidez das membranas espermáticas, causando rápida e irreversível perda da motilidade (HOLTZ, 2000b). Para diminuir o acúmulo de espécies oxigênio reativas durante a estocagem, Luvoni et al. (2002) testaram o efeito da taurina, um β -amino ácido contendo sulfa e presente em altas concentrações no espermatozóide, plasma seminal e fluído epididimal de gatos domésticos (BUFF et al., 2001), no diluente usado para a congelação do espermatozóide de gatos. Com a adição da taurina foi observado um efeito benéfico na motilidade espermática após descongelação, embora o mesmo efeito positivo não tenha sido encontrado na porcentagem de acrossomos intactos (LUVONI et al., 2002).

Estimulantes da motilidade como a cafeína, a pentoxifilina e a 2'-deoxiadenosina mostraram ser eficientes em aumentar a motilidade dos espermatozóides do ejaculado ou do epidídimo de gatos após a descongelação. Esse efeito dose dependente observado sobre a motilidade produziu um movimento hiperativado sem causar, contudo, efeito deletério à longevidade dessas células espermáticas (STACHECKI et al., 1994; STACHECKI et al., 1995).

Nos gatos domésticos, a descongelação das palhetas é realizada, normalmente, por imersão em banho-maria à 37°C por 30 segundos (TSUTSUI et al., 2000b; ZAMBELLI et al., 2002; TSUTSUI et al., 2003; BARAN et al., 2004). Nelson et al. (1999) compararam três métodos diferentes para a descongelação do espermatozóide epididimal do gato doméstico: 1) 25°C (temperatura ambiente), 2) 36°C por 2 minutos e 3) 50°C por 10 segundos, e observaram melhores resultados de motilidade quando utilizaram o último protocolo.

Material e métodos

MATERIAL E MÉTODOS

1. Local

O experimento foi realizado no Laboratório de Reprodução de Pequenos Animais e Silvestres (REPAS) e no Centro de Diagnóstico e Biotecnologia em Reprodução Animal (CERAN), ambos pertencentes ao Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária (DRARV) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), UNESP, Campus de Botucatu.

2. Animais

Todos os animais do experimento foram mantidos no gatil do laboratório REPAS em jaulas (1,4 m de comprimento x 0,78 m de profundidade x 0,55 m de altura) (Figura 1) e acesso à área externa durante o dia (Figura 2). Os animais foram expostos a mais de 12 horas de luz natural por dia e alimentados com ração seca e água *ad libitum*. Os machos e as fêmeas permaneceram em gatis separados, de forma que a visualização entre os animais não era possível e apenas contatos auditivo e olfatório estavam presentes.



FIGURA 1. Dependências do gatil para os animais do experimento.



FIGURA 2. Pátio de acesso durante o dia para os animais do experimento.

2.1. Machos

Foram utilizados dois gatos adultos (1,5 e 6 anos de idade) previamente selecionados após repetidas colheitas e análise de sêmen. Esses machos apresentaram em média motilidade espermática superior a 80% e vigor 4,5 e foram classificados como normospermicos (menos que 40% de alterações da morfologia espermáticas) após análise de lâminas coradas com Fast Green/Rosa Bengala (POPE et al., 1991a).

2.2. Fêmeas

Foram utilizadas 19 gatas com idade entre 1,5 a 4 (2,6 +/- 0,7) anos e peso entre 2,5 a 4,3 (3,0 +/- 0,6) Kg e de propriedade particular. Com exceção da gata 9, a qual não tinha histórico reprodutivo, as demais gatas apresentavam histórico de maternidade dentro de um período de dois a seis meses anteriormente ao experimento. Apenas as gatas 26 e 27 tinham relato de administração de anticoncepcional há cinco meses. Nenhuma das gatas havia sido submetida a protocolos de indução de estro e ovulação previamente ao experimento. A gata 16 foi utilizada duas vezes com intervalo de quatro meses entre as induções de estro e inseminada pelos dois métodos; intra-uterino e intra-vaginal.

3. Colheita de sêmen

As amostras de sêmen dos gatos foram colhidas utilizando-se uma vagina artificial, a qual foi confeccionada a partir de tetinas de borracha cortadas e adaptadas a tubos plásticos tipo Eppendorf® de 1,5 mL (SOJKA et al., 1970) (Figura 3) e mantidas à 38° C até o momento da colheita. Para a colheita de sêmen, foram utilizados manequins animados (Figura 4) ou inanimados (Figura 5). Após o gato montar no manequim e expor o pênis, a vagina artificial era encaixada no pênis e retirada após a ejaculação. Cada gato foi colhido duas vezes consecutivas, com intervalos de 5 a 10 minutos, utilizando-se tubos diferentes para cada ejaculado. As colheitas foram realizadas com intervalos de no mínimo dois dias.



FIGURA 3. Modelo de vagina artificial utilizada para a colheita de sêmen.



FIGURA 4. Colheita de sêmen com manequim animado.



FIGURA 5. Colheita de sêmen com manequim inanimado.

Logo após cada colheita, 50 µL de meio TRIS/OEP (Tabela 2) eram adicionados ao sêmen *in natura*.

TABELA 2. Composição dos diluentes TRIS/OEP e TRIS/OEP/GLICEROL utilizados para diluição e congelação do sêmen, Botucatu, 2007.

Componentes	Quantidade	
	TRIS/OEP	TRIS/OEP/GLICEROL
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	0,02 g	0,02 g
Gema de ovo	20 mL	20 mL
OEP (Orvus ES Paste)	1 mL	1 mL
Glicerol	-	8 mL
Água destilada e deionizada	para completar 100 mL	para completar 100 mL

Meio TRIS/OEP osmolaridade de 310 mOsm/ L

Meios TRIS/OEP E TRIS/OEP/GLICEROL pH aproximadamente de 6,7

4. Avaliação do sêmen após colheita

Após colheita e diluição em meio TRIS/OEP, as duas amostras colhidas do mesmo gato foram unidas e o volume de sêmen ajustado para 140 a 200 µL totais, dependendo da quantidade ejaculada. Esse volume foi considerado o volume inicial de trabalho (Vi). Uma alíquota de 5 µL de sêmen foi diluída novamente em um tubo separado com o meio TRIS/OEP, visando obter uma concentração final entre 50 a 100 x 10⁶ espermatozóides/ mL para as avaliações de movimento espermático e integridade de membrana espermática.

Todas as amostras de sêmen permaneceram à 37°C durante o período de análise.

4.1. Movimento espermático

A avaliação do movimento espermático foi realizada pelo método de CASA (análise computadorizada do movimento espermático), utilizando o

sistema HTR–IVOS-10 (Hamilton Thorn Research – Animal Version 12,0 L, EUA), previamente ajustado para o sêmen de gato (Anexo 1). As variáveis analisadas pelo sistema se encontram no Quadro 2.

QUADRO 2. Variáveis do movimento espermático analisadas pelo método de CASA.

MT (%) - motilidade total
MP (%) - motilidade progressiva
VCL ($\mu\text{m/s}$) - velocidade espermática ao longo da trajetória real
VAP ($\mu\text{m/s}$) - velocidade espermática ao longo de uma trajetória média
VSL ($\mu\text{m/s}$) - velocidade espermática ao longo de uma linha reta
LIN (%) – linearidade, dada pela fórmula VSL/VCL
STR (%) - índice retilíneo, dado pela fórmula VSL/VAP
ALH (μm) - deslocamento lateral da cabeça
BCF (Hz) - frequência de batimento flagelar
R (%) – rápidos, apresentando $\text{VAP} > 70 \mu\text{m/s}$

Para a avaliação, uma gota de sêmen foi colocada em câmara de Makler (HTMA) aquecida e analisada à temperatura de 38°C. Para cada amostra de sêmen, duas a três gotas foram avaliadas e a média dos três melhores campos foi anotada.

4.2. Concentração espermática

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

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

C = concentração de espermatozóides por mL

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

4.3. Integridade da membrana plasmática

Para a avaliação da integridade de membrana plasmática, foi utilizada a combinação de duas sondas fluorescentes: Iodeto de Propídio (P-4170, SIGMA) e Diacetato de 6-Carboxifluoresceína (C-0662, SIGMA), de acordo com a técnica descrita por Harrison & Vickers (1990). A preparação das soluções se encontra na Tabela 3.

TABELA 3. Composição das soluções estoque e de trabalho das sondas fluorescentes utilizadas para a avaliação da integridade de membrana plasmática, Botucatu, 2007.

SOLUÇÃO ESTOQUE			SOLUÇÃO TRABALHO
Descrição	Composição	Quantidade	Quantidade
1. Solução estoque de fluoresceína	Diacetato de 6-carboxifluoresceína	9,2 mg	20 µL
	DMSO	20 mL	
2. Solução estoque de iodeto de propídio	Iodeto de propídio	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%	Citrato de sódio	3 g	0,96 mL
	Água destilada	100 mL	

Uma amostra de 10 μ L de sêmen foi adicionada a 40 μ L da solução de trabalho. Após 10 minutos de incubação, uma gota do material foi depositada entre lâmina e lamínula e analisada em microscópio de epifluorescência (NIKON – Episcopic Fluorescence Attchment “EFA” HalogenLamp Set) utilizando objetiva de 40x. Foram contadas 100 células e essas classificadas como:

- ❖ **Células com membrana íntegra:** células emitindo fluorescência de cor verde.
- ❖ **Células com membrana lesada:** células emitindo fluorescência de cor vermelha ou de cores verde e vermelha.

4.4. Espermiograma

A avaliação da morfologia espermática foi realizada utilizando-se lâminas coradas com Rosa Bengala/ Fast Green [1% Rosa Bengala (SIGMA), 1% Fast Green FCF (SIGMA) e 40% de etanol em uma solução tampão de fosfato dissódico 0,2 M e ácido cítrico 0,1 M], como descrito por Pope et al. (1991a). Uma alíquota de 2 μ L foi adicionada a 45 μ L de citrato de sódio a 2,9% e a essa mistura foram acrescentados 50 μ L do corante Rosa Bengala/ Fast Green. Após 70 segundos à temperatura ambiente, foram realizados esfregaços em lâmina, utilizando de 5 a 10 μ L, e secos em temperatura de 37°C.

Para cada amostra de sêmen, foram avaliadas 200 células espermáticas utilizando microscópio de luz em aumento de 1000x e a classificação das anormalidades foi realizada de acordo com Mies Filho (1987) (Anexo 2). Os resultados foram expressos em porcentagem.

O acrossomo foi classificado como intacto, quando a região apical da cabeça do espermatozóide foi corada em azul escuro arroxeadado, ou lesado, quando esta região se apresentava com coloração rosa claro ou com anormalidades como; irregularidades de contorno ou coloração heterogênea.

5. Congelação do sêmen

Após a avaliação do sêmen, apenas as amostras apresentando motilidade total maior que 80% e motilidade progressiva superior a 60% foram utilizadas. Para a congelação do sêmen, a fórmula abaixo foi usada para se determinar o volume de meio TRIS/OEP que deveria ser adicionado à amostra de sêmen, com a finalidade de obter-se uma concentração final de 25×10^6 de espermatozóides móveis por palheta francesa com capacidade de 250 μL .

$$V_a = (E \times V_i \times MT \times 5 \times 10^{-5}) - V_i$$

V_a = volume de meio TRIS/OEP que deve ser adicionado à amostra de sêmen em μL .

E = concentração de espermatozóides por mL dividido por 10^6 .

V_i = volume inicial de sêmen em μL .

MT = porcentagem de motilidade total.

Logo após a adição do meio TRIS/OEP, foi gotejado lentamente o meio TRIS/OEP/GLICEROL (Tabela 2) com volume igual ao volume final da mistura de meio TRIS/OEP e sêmen (ver fórmula abaixo) resultando em uma concentração final de 4% de glicerol.

$$V_f = V_i + V_a$$

V_f = volume final de meio TRIS/OEP/GLICEROL a ser acrescentado à amostra em μL .

V_i = volume inicial da amostra em μL .

V_a = volume de meio TRIS/OEP adicionado à amostra em μL .

A amostra de sêmen, após adição do meio TRIS/OEP/GLICEROL, foi homogeneizada lentamente com auxílio de uma pipeta automática e envasada em palhetas francesas de 250 µL. As palhetas foram lacradas e permaneceram por 20 minutos em refrigerador (Minitüb®) programado à 5°C. Na sequência, as palhetas foram transferidas para uma caixa de isopor (comprimento de 40 cm x largura de 30 cm x altura de 34 cm) e permaneceram por 15 minutos em vapor de nitrogênio líquido a 6 cm de uma coluna líquida de 3 cm de nitrogênio líquido. Após este período, as amostras foram imersas no nitrogênio líquido e devidamente armazenadas em botijão criogênico.

6. Descongelamento do sêmen

As amostras de sêmen foram descongeladas mergulhando as palhetas em banho-maria à 46°C por 12 segundos. Para cada inseminação foram descongeladas quatro palhetas do mesmo gato. Após descongelamento do sêmen, o conteúdo das palhetas foi colocado em um tubo de plástico tipo Eppendorf® aquecido à 37°C. A amostra foi homogeneizada e uma alíquota (40 µL) foi retirada para avaliação da motilidade espermática.

O tubo de plástico contendo a amostra foi centrifugado a 250 xg durante 8 minutos e parte do sobrenadante foi retirado, deixando-se o *pellet* formado e aproximadamente 100 µL de meio. O *pellet* foi gentilmente ressuspenso com o auxílio de uma pipeta automática. Alíquotas foram retiradas para a avaliação de motilidade (2 µL), integridade de membrana (2 µL) e espermiograma (2 µL). As avaliações foram realizadas como descrito anteriormente.

O tubo plástico contendo a amostra permaneceu aquecido à 37°C e protegido da luz até o momento da inseminação, dentro de no máximo 10 minutos.

6.1. Cálculo da quantidade de espermatozoides por inseminação

Uma alíquota de 50 µL do sobrenadante retirado da amostra foi adicionada à 50 µL de água destilada (diluição 1:2) para a determinação da concentração. Após, foram calculadas a quantidade total de espermatozoides no sobrenadante e a porcentagem de perda (Ps) pelo processo de centrifugação, visando determinar a quantidade real de sêmen utilizado em

cada inseminação. Também foram descontados 6 a 8% da quantidade de sêmen pós-centrifugação, correspondentes a quantidade retirada para análise.

$$Ps = \frac{0,25 \times Vs \times Ns}{3Vs + 300}$$

Ps = porcentagem de espermatozóides perdidos no sobrenadante.

Vs = volume do sobrenadante retirado em μL .

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

$$EM = \left(\frac{3Vs + 300}{25} \right) \times (100 - Ps) \times 98 \times MT_D$$

EM = número total de espermatozóides móveis por inseminação.

Vs = volume do sobrenadante retirado em μL .

Ps = porcentagem de espermatozóides perdidos no sobrenadante.

MT_D = motilidade espermática total pós-descongelção.

6.2. Avaliação da integridade de membrana plasmática, integridade do acrossomo e função mitocondrial.

Para essas avaliações foram utilizadas em associação três sondas fluorescentes, sendo elas; Iodeto de Propídio (IP), FITC-PSA (glutinina de *Pisum sativum* conjugada a isotiocianato de fluoresceína) e JC-1 (Iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina) como descrito por Celeghini (2005). A preparação das soluções de trabalho para cada sonda fluorescente se encontra no Anexo 3.

Foram realizadas três avaliações para cada gato, com duas palhetas de partidas diferentes em cada avaliação. Após descongelção, o conteúdo das

duas palhetas foi colocado em um tubo plástico de 1,5 mL tipo Eppendorf® aquecido à 37°C. A amostra foi centrifugada a 250 xg durante 8 minutos e o sobrenadante retirado, deixando apenas o *pellet* e 100 µL de sobrenadante. O *pellet* foi ressuspendido e uma alíquota de 10 µL de sêmen foi adicionada à 40 µL de meio Ham's F10 (N-6013, SIGMA) aquecido à 37°C. A essa mistura foram adicionadas as soluções de trabalho, sendo; 0,8 µL de Iodeto de Propídio, 2 µL de JC-1 e, após 8 a 10 minutos de incubação à 37°C, 30 µL de FITC-PSA.

Uma gota da amostra foi depositada entre lâmina e lamínula, previamente aquecidas a 37°C, e analisada em microscópio de epifluorescência (NIKON – Episcopic Fluorescence Attchment “EFA” HalogenLamp Set) utilizando objetiva de 100x. Para cada amostra foram confeccionadas duas lâminas e, em cada uma, 100 células foram contadas e classificadas conforme o Quadro 3.

QUADRO 3. Classificação das células espermáticas de acordo com a ausência ou com a cor de fluorescência emitida pelas sondas em regiões do espermatozóide.

CÉLULAS ESPERMÁTICAS	IP	FITC-PSA	JC-1
	Núcleo	Acrossomo	Peça intermediária
Membrana plasmática intacta com acrossomo intacto e alto potencial de membrana mitocondrial	■	■	vermelho
Membrana plasmática intacta com acrossomo intacto e baixo potencial de membrana mitocondrial	■	■	verde
Membrana plasmática intacta com acrossomo lesado e alto potencial de membrana mitocondrial	■	verde	vermelho
Membrana plasmática intacta com acrossomo lesado e baixo potencial de membrana mitocondrial	■	verde	verde
Membrana plasmática lesada com acrossomo intacto e alto potencial de membrana mitocondrial	vermelho	■	vermelho
Membrana plasmática lesada com acrossomo intacto e baixo potencial de membrana mitocondrial	vermelho	■	verde
Membrana plasmática lesada com acrossomo lesado e alto potencial de membrana mitocondrial	vermelho	verde	vermelho
Membrana plasmática lesada com acrossomo lesado e baixo potencial de membrana mitocondrial	vermelho	verde	verde

7. Preparação das fêmeas para inseminação artificial

Após período de adaptação ao gatil, aproximadamente 20 dias, as fêmeas foram avaliadas através dos exames de citologia vaginal, ultrasonografia e observação do comportamento frente ao macho, visando determinar o momento adequado para a indução do crescimento folicular.

7.1. Observação do comportamento

Para a observação do comportamento estral, a fêmea foi colocada junto ao macho, separados apenas por grades. Sinais de rolamento, vocalização e lordose (JOHNSTON et al., 2001) foram interpretados como característicos do pro-estro e estro. Apesar da importância da observação do comportamento, estes achados apenas complementaram o resultado da citologia vaginal, uma vez que gatas em estro citológico nem sempre apresentam sinais comportamentais característicos de estro.

Devido ao comportamento arisco de algumas fêmeas, a visualização do comportamento frente ao macho foi excluída, evitando assim o estresse causado por esse manejo.

7.2. Citologia vaginal

Para o exame de citologia vaginal, as fêmeas foram contidas fisicamente e uma escova ginecológica foi introduzida o mais cranial possível no canal vaginal e girada delicadamente. O material coletado foi transferido para uma lâmina de vidro, corado com Panótico (Hematocor®) e avaliado em microscópio de luz utilizando aumentos de 200x ou 400x. Foram classificadas 100 células de acordo com os critérios apresentados por Johnston et al. (2001), e as fêmeas apresentando mais de 60% de células superficiais foram consideradas em estro (SHILLE et al., 1979) (Figura 6).

7.3. Ultra-sonografia

O exame ultra-sonográfico foi utilizado com o objetivo de determinar se as fêmeas estavam prenhes anteriormente ao experimento. Após a realização de palpação abdominal, as fêmeas foram submetidas ao exame com ultra-som (Scanner 200, Piemedical) trans-abdominal utilizando probe setorial de 7,5 MHz para a visualização de vesículas embrionárias.

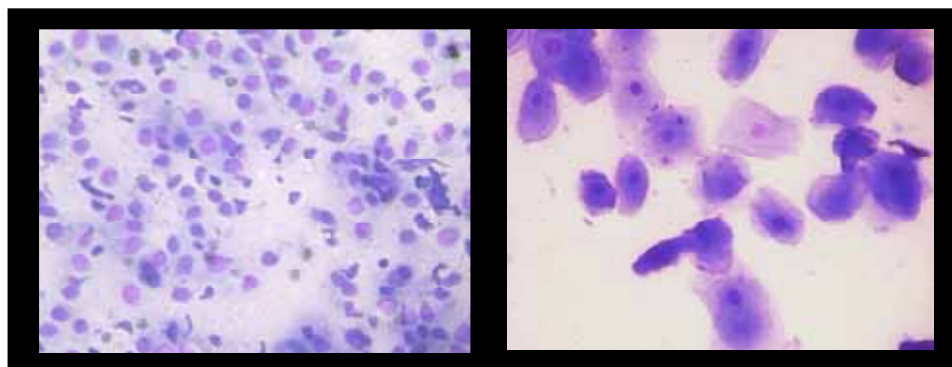


FIGURA 6. Lâminas de citologia vaginal coradas com Panótipo (aumento de 400x) mostrando uma gata fora da fase de estro à esquerda e uma gata na fase de estro à direita.

8. Indução do crescimento folicular e ovulação

Após realização dos exames, as fêmeas que não estavam prenhes e nem na fase de estro foram submetidas ao protocolo de indução do crescimento folicular com uma aplicação única de 100 UI de eCG (gonadotrofina coriônica eqüina – Novormon® 5000UI, Vetrepharm) por via IM (intra-muscular). Após 82 a 84 horas da aplicação do eCG, 100 UI de hCG (gonadotrofina coriônica humana – Vetecor® 5000UI, Calier) foram administradas por via IM.

9. Procedimento de inseminação artificial

As fêmeas foram inseminadas utilizando-se o método intra-vaginal ou o método intra-uterino, determinados aleatoriamente para cada gata, após 30 horas da indução da ovulação. Para os dois métodos de inseminação, as fêmeas foram submetidas à anestesia, após jejum alimentar de 12 horas e hídrico de 2 horas, com uma aplicação de 15 mg/ Kg de cloridrato de quetamina (Dopalen® 10%, Vetbrands) e 1 mg/ Kg de cloridrato de xilazina (Xilazin® 2%, Syntec) por via IM e manutenção com halotano (Tanohalo®, Cristália).

9.1. Método intra-vaginal

Após anestesia, foi realizado o exame de citologia vaginal, como descrito anteriormente, e apenas as fêmeas apresentando mais de 60% de células superficiais foram inseminadas. Para este método de IA, foram utilizadas no total 8 gatas, sendo 4 fêmeas inseminadas com amostras de sêmen do gato A e 4 fêmeas com amostras de sêmen do gato B.

Para a inseminação, as gatas foram colocadas em decúbito dorsal e com o posterior elevado. Uma sonda uretral para gatos rígida (Provar®), com 1,3 mm de diâmetro, foi introduzida no canal vaginal de 30 a 40 mm e, com o auxílio de uma pipeta automática, 100 µL de sêmen foi depositado lentamente na vagina (Figura 7). As gatas, após inseminação, permaneceram com o posterior elevado durante 20 minutos, evitando-se o refluxo de sêmen.



FIGURA 7. Inseminação artificial pelo método intra-vaginal utilizando uma sonda uretral para gatos.

9.2. Método intra-uterino

Para este método de IA, foram utilizadas no total 10 gatas, sendo 5 fêmeas inseminadas com amostras de sêmen do gato A e 5 fêmeas com amostras de sêmen do gato B.

A inseminação pelo método intra-uterino foi realizada através de laparotomia pela linha alba. Após exposição de parte do corno uterino, um catéter intravenoso de 22G (Angiocath®, BD) foi introduzido até o lúmen do

útero e, na seqüência, apenas a parte de plástico do catéter foi deslizada para o interior do lúmen no sentido cranial, desta forma, chegando próximo ao final do corno uterino. Metade da amostra de sêmen (30 a 50 μ L) foi colocada no canhão do catéter (Figura 8) e, com o auxílio de uma seringa de 1 mL contendo ar e massagem no corno uterino no sentido cranial, o sêmen foi depositado lentamente no interior do lúmen uterino (Figura 9). O mesmo procedimento de inseminação foi realizado em ambos os cornos uterinos. Após cirurgia, foram administrados 0,2 mg/ Kg de meloxicam e 30.000 UI/ Kg de pentabiótico, ambos por via SC.

0



FIGURA 8. Inseminação artificial intra-uterina. Deposição do sêmen no canhão do catéter.



FIGURA 9. Inseminação artificial intra-uterina. Deposição do sêmen no lúmen uterino.

10. Diagnóstico e acompanhamento da gestação

Após 18 a 21 dias da inseminação artificial, foi realizado o diagnóstico de gestação através de exame ultra-sonográfico como descrito anteriormente. Foi acompanhada a gestação de apenas uma das gatas prenhes até o parto e desmame dos filhotes. As demais gatas foram submetidas a ovário-salpingo-histerectomia (OSH), após jejum alimentar e hídrico, utilizando anestesia com 15 mg/ Kg de cloridrato de quetamina (Dopalen®, 10%, Vetbrands), 1 mg/ Kg de cloridrato de xilazina (Xilazin® 2%, Syntec), 0,2 mg/ Kg de sulfato de morfina (Dimorf® 1%, Cristália) por via IM e manutenção com halotano (Tanohalo®, Cristália). Após cirurgia, foram administrados 0,2 mg/ Kg de meloxicam e 30.000 UI/ Kg de pentabiótico, ambos por via SC.

11. Avaliação da resposta ovariana ao tratamento hormonal

Após 18 a 21 dias da IA, os ovários das fêmeas submetidas à OSH (n=14) foram avaliados quanto ao número de CLs e de folículos, anotando-se a quantidade de folículos acima de 2,0 mm de diâmetro.

12. Dosagem sérica de progesterona

Foram coletadas amostras de sangue por venopunção da jugular no momento da IA e no dia da OSH, com 18 a 21 dias após a IA, em todas as gatas, com exceção apenas da gata 16, da qual o sangue não foi coletado durante a gestação. Após coleta do sangue, a amostra foi centrifugada e o soro reparado e estocado à -80°C para posterior dosagem da progesterona.

A dosagem sérica de progesterona foi realizada utilizando kits comerciais em fase sólida (Coat A – Count Diagnostics Products Corporation, Los Angeles, Califórnia, USA) e leitura por sistema de radioimunoensaio [Packard Cobra II Auto Gamma (GMI Inc. – Minnesota - USA)], seguindo as instruções do fabricante. A dosagem foi realizada no Laboratório de Endocrinologia do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ, Unesp, Campus de Botucatu. O processamento de todas as amostras foi realizado em um único ensaio, sendo o coeficiente de variação intra-ensaio de 4,04%.

13. Análise estatística

Para a comparação entre as características espermáticas observadas antes e após o processo de congelação/descongelação para as amostras dos dois gatos (A e B) e também para a comparação entre os valores obtidos para os gatos A e B em cada momento (antes e após congelação/descongelação) foram utilizados o teste paramétrico de comparações múltiplas de Tukey para as variáveis de IMP, MP, VAP, VCL, VSL, LIN, STR, BCF, ALH, R, defeitos totais, defeitos maiores, defeitos menores, defeitos de peça intermediária, defeitos maiores de cauda, defeitos maiores de cabeça, defeitos menores de cabeça e defeitos de inserção e o teste não paramétrico de Wilcoxon para as variáveis de MT, defeitos de acrossomo, defeitos menores de cauda, gota citoplasmática proximal e distal, uma vez que estas últimas não atenderam as pressuposições necessárias para a execução da análise de variância, como normalidade e igualdade de variância (VIEIRA, 2004; BUSSAB & MORETTIN, 2006).

Os resultados obtidos para a integridade de membrana plasmática pelo Iodeto de Propídio junto ao Diacetato de Carboxifluoresceína ou ao PSA e JC-1, e os resultados de integridade de acrossomo dados pelo método descrito por Pope et al. (1991a) ou pelo PSA foram comparados utilizando-se o teste F da ANOVA. A comparação entre os resultados positivo de prenhez obtidos para cada método de IA (intra-vaginal e intra-uterino) foi realizada utilizando-se o teste exato de Fisher (VIEIRA, 2004).

Para todos os testes realizados foi considerado o nível de significância $p < 0,05$.

Resultados

RESULTADOS

1. Qualidade do sêmen antes e após o processo de congelação/descongelação

As médias obtidas para cada característica espermática nos momentos antes e após o processo de congelação/descongelação para os dois gatos se encontram na Tabela 4.

Para ambos os gatos, comparando-se o momento antes da congelação e após a descongelação, foram encontrados uma redução ($p<0,05$) dos valores de integridade de membrana plasmática, motilidade total, motilidade progressiva, VAP, VSL, VCL, LIN, R, porcentagem de acrossomos normais, defeitos menores e gota citoplasmática distal e um aumento ($p<0,05$) dos valores de ALH, defeitos maiores, defeitos totais, defeitos maiores de cauda e defeitos de peça intermediária.

Somente para o gato A ocorreram uma redução ($p<0,05$) dos valores de defeitos menores de cabeça e defeitos menores de cauda e um aumento ($p<0,05$) do valor de BCF quando se comparou os momentos antes e depois da congelação/descongelação. Já para o gato B, uma redução ($p<0,05$) dos valores de BCF, STR e gota citoplasmática proximal foi observada após a descongelação.

Comparando os gatos anteriormente à congelação ($p<0,05$), valores maiores de VAP, VSL, LIN, porcentagem de acrossomos normais, defeitos maiores de cabeça, defeitos de peça intermediária, defeitos de inserção, defeitos menores de cauda e valor menor de gota citoplasmática distal foram observados para o gato A. Após a descongelação, foram obtidos para o gato A valores maiores de BCF, LIN, defeitos de cabeça e defeitos de inserção e valores menores de ALH, defeitos maiores, defeitos totais, defeitos de peça intermediária, defeitos menores de cabeça, defeitos menores de cauda e gota citoplasmática distal quando comparado ao gato B ($p<0,05$).

TABELA 4. Médias ($\pm$ desvio padrão) obtidas para as características espermáticas antes e após o processo de congelamento/descongelamento para os gatos A e B, Botucatu, 2007.

Gato	A		B	
	Antes	Depois	Antes	Depois
IMP (%)	89,0 $\pm$ 1,9 ^{Aa}	45,0 $\pm$ 2,7 ^{Ab}	88,5 $\pm$ 2,1 ^{Aa}	44,8 $\pm$ 4,7 ^{Ab}
MT (%)	88,3 $\pm$ 1,7 ^{Aa}	53,4 $\pm$ 4,5 ^{Ab}	88,7 $\pm$ 1,9 ^{Aa}	52,3 $\pm$ 9,1 ^{Ab}
MP (%)	66,8 $\pm$ 2,9 ^{Aa}	33,8 $\pm$ 5,6 ^{Ab}	66,2 $\pm$ 2,5 ^{Aa}	32,0 $\pm$ 5,8 ^{Ab}
VAP (μ m/s)	140,2 $\pm$ 3,1 ^{Aa}	96,9 $\pm$ 4,5 ^{Ab}	128,6 $\pm$ 5,3 ^{Ba}	96,3 $\pm$ 3,6 ^{Ab}
VSL (μ m/s)	123,2 $\pm$ 3,2 ^{Aa}	85,3 $\pm$ 5,0 ^{Ab}	114,1 $\pm$ 3,7 ^{Ba}	81,6 $\pm$ 2,8 ^{Ab}
VCL (μ m/s)	171,7 $\pm$ 2,8 ^{Aa}	145,4 $\pm$ 3,9 ^{Ab}	166,2 $\pm$ 4,5 ^{Aa}	148,9 $\pm$ 5,6 ^{Ab}
ALH (μ m)	4,3 $\pm$ 0,1 ^{Aa}	4,9 $\pm$ 0,1 ^{Ab}	4,5 $\pm$ 0,2 ^{Aa}	5,5 $\pm$ 0,3 ^{Bb}
BCF (Hz)	33,5 $\pm$ 1,5 ^{Aa}	36,2 $\pm$ 1,4 ^{Ab}	33,6 $\pm$ 1,0 ^{Aa}	31,5 $\pm$ 1,0 ^{Bb}
STR (%)	87,5 $\pm$ 0,8 ^{Aa}	86,0 $\pm$ 1,7 ^{Aa}	86,7 $\pm$ 0,9 ^{Aa}	83,1 $\pm$ 1,1 ^{Ab}
LIN (%)	71,8 $\pm$ 1,3 ^{Aa}	58,5 $\pm$ 2,1 ^{Ab}	68,7 $\pm$ 2,3 ^{Ba}	54,8 $\pm$ 1,0 ^{Bb}
R (%)	84,3 $\pm$ 2,9 ^{Aa}	41,3 $\pm$ 5,4 ^{Ab}	84,8 $\pm$ 2,5 ^{Aa}	41,9 $\pm$ 7,8 ^{Ab}
Def maiores (%)	12,1 $\pm$ 1,8 ^{Aa}	59,4 $\pm$ 2,1 ^{Ab}	9,8 $\pm$ 1,9 ^{Aa}	63,7 $\pm$ 2,4 ^{Bb}
Def menores (%)	3,7 $\pm$ 1,6 ^{Aa}	0,6 $\pm$ 0,6 ^{Ab}	4,6 $\pm$ 2,2 ^{Aa}	0,8 $\pm$ 0,8 ^{Ab}
Def totais (%)	15,8 $\pm$ 2,9 ^{Aa}	60,0 $\pm$ 1,7 ^{Ab}	14,5 $\pm$ 3,4 ^{Aa}	64,5 $\pm$ 2,3 ^{Bb}
AN (%)	97,4 $\pm$ 0,6 ^{Aa}	57,5 $\pm$ 5,6 ^{Ab}	94,1 $\pm$ 2,1 ^{Ba}	52,3 $\pm$ 6,4 ^{Ab}
Def maiores cab (%)	0,9 $\pm$ 0,3 ^{Aa}	1,1 $\pm$ 0,6 ^{Aa}	0,3 $\pm$ 0,3 ^{Ba}	0,6 $\pm$ 0,6 ^{Ba}
Gota cito proximal (%)	0,1 $\pm$ 0,1 ^{Aa}	0,1 $\pm$ 0,2 ^{Aa}	0,6 $\pm$ 0,2 ^{Ba}	0,0 ^{Ab}
Def PI (%)	3,0 $\pm$ 1,0 ^{Aa}	4,7 $\pm$ 1,3 ^{Ab}	1,9 $\pm$ 0,9 ^{Ba}	5,3 $\pm$ 0,9 ^{Bb}
Def maiores cauda (%)	4,9 $\pm$ 1,6 ^{Aa}	25,1 $\pm$ 4,4 ^{Ab}	2,3 $\pm$ 1,8 ^{Ba}	25,4 $\pm$ 7,6 ^{Ab}
Def menores cab (%)	1,1 $\pm$ 0,3 ^{Aa}	0,3 $\pm$ 0,3 ^{Ab}	1,0 $\pm$ 0,4 ^{Aa}	0,9 $\pm$ 0,5 ^{Ba}
Def Inserção (%)	0,7 $\pm$ 0,3 ^{Aa}	0,8 $\pm$ 0,5 ^{Aa}	0,4 $\pm$ 0,3 ^{Ba}	0,3 $\pm$ 0,4 ^{Ba}
Def menores cauda (%)	1,5 $\pm$ 1,0 ^{Aa}	0,0 ^{Ab}	0,5 $\pm$ 0,4 ^{Ba}	0,6 $\pm$ 0,7 ^{Ba}
Gota cito distal (%)	0,9 $\pm$ 1,3 ^{Aa}	0,1 $\pm$ 0,2 ^{Ab}	3,2 $\pm$ 2,1 ^{Ba}	0,4 $\pm$ 0,3 ^{Bb}

IMP (integridade de membrana plasmática); MT (motilidade total); MP (motilidade progressiva); VAP (velocidade espermática ao longo de uma trajetória média); VSL (velocidade ao longo de uma linha reta); VCL (velocidade espermática ao longo da trajetória real); ALH (deslocamento lateral da cabeça); BCF (frequência de batimento flagelar); STR (índice retilíneo); LIN (linearidade); R (rápidos); Def maiores (defeitos maiores); Def menores (defeitos menores); Def totais (defeitos totais); AN (acrossomos normais); Def maiores cab (defeitos maiores de cabeça); Gota cito proximal (gota citoplasmática proximal); Def PI (defeitos de peça intermediária); Def maiores cauda (defeitos maiores de cauda); Def menores cab (defeitos menores de cabeça); Def inserção (defeitos de inserção); Def menores cauda (defeitos menores de cauda) e Gota cito distal (gota citoplasmática distal).

Letras maiúsculas iguais representam semelhança entre os gatos dentro do mesmo momento ($p < 0,05$).

Letras minúsculas iguais representam semelhança entre os momentos para o mesmo gato ($p < 0,05$).

Os valores de integridade de membrana presentes na Tabela 4 são referentes aos resultados obtidos com a técnica descrita por Harrison & Vickers (1990), utilizando Iodeto de Propídio e Diacetato de 6-Carboxifluoresceína (Figura 9). Os resultados obtidos com a coloração usando as sondas fluorescentes IP, FITC-PSA e JC-1 (Figura 11), descrita por Celeghini (2005), se encontram na Tabela 5.

Somente os espermatozóides com membrana íntegra apresentaram alto potencial de membrana mitocondrial. Apenas o gato A apresentou uma pequena porcentagem ($2,7 \pm 0,6$) de espermatozóides com lesão de membrana acrossomal com membrana plasmática íntegra, chamada de reação acrossomal verdadeira.

Para a porcentagem de membrana plasmática íntegra, não foi observada diferença ($p < 0,05$) entre os dois métodos de coloração com sondas fluorescentes utilizados (IP com Diacetato de Carboxifluoresceína ou IP com PSA e JC-1). Já para a avaliação da porcentagem de acrossomos íntegros, o método de Pope et al. (1991a) obteve maior quantidade ($p < 0,05$) de acrossomos classificados como lesados quando comparado à porcentagem de espermatozóides classificados como lesados pelo método com PSA.

TABELA 5. Médias ($\pm$ desvio padrão) das porcentagens de IMP, MAL, RAV e APM obtidas após descongelação do sêmen para os gatos A e B utilizando a técnica descrita por Celeghini (2005), Botucatu, 2007.

Gato	IMP	MAL	RAV	APM
A	$43,0 \pm 2,6$	$35,3 \pm 2,3$	$2,7 \pm 0,6$	$18,0 \pm 6,1$
B	$39,7 \pm 0,6$	$39,0 \pm 4,6$	0,0	$15,7 \pm 3,5$
Média	$41,3 \pm 2,5$	$37,2 \pm 3,8$	$1,3 \pm 1,5$	$16,8 \pm 4,6$

IMP (integridade de membrana plasmática); MAL (membrana acrossomal íntegra); RAV (reação acrossomal verdadeira, representado pela porcentagem de espermatozóides com membrana plasmática íntegra e membrana acrossomal lesada) e APM (alto potencial de membrana mitocondrial).

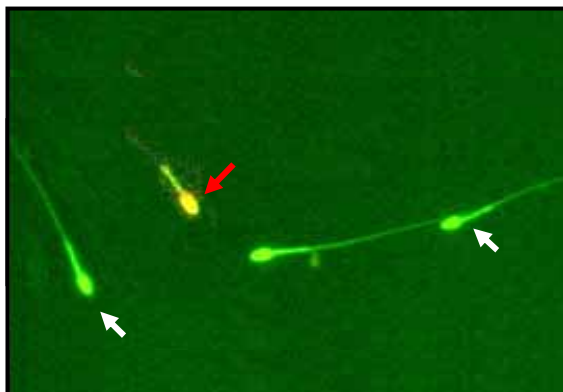


FIGURA 10. Espermatozóides de gato doméstico corados com Iodeto de Propídio e Diacetato de Carboxifluoresceína. Setas brancas indicam espermatozóides com membrana plasmática intacta, em verde. Seta vermelha indica espermatozóide com membrana plasmática lesada, região da cabeça em vermelho.

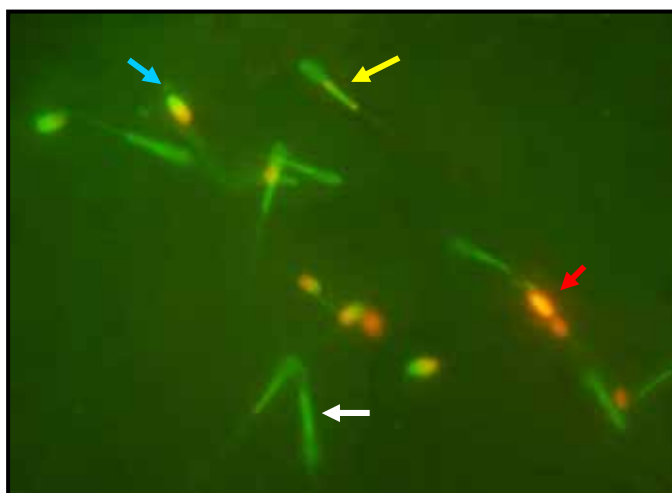


FIGURA 11. Espermatozóides de gato doméstico corados com IP, FITC-PSA e JC-1. Seta azul indica lesão da membrana acrossomal, região acrossomal em verde. Seta vermelha indica lesão de membrana plasmática, região da cabeça em vermelho. Seta amarela indica alto potencial de membrana mitocondrial, pontos alaranjados ao longo da peça intermediária. Seta branca indica baixo potencial de membrana mitocondrial, peça intermediária em verde.

2. Resposta ovariana a indução do estro e ovulação

No total 19 fêmeas foram submetidas à indução do estro, sendo que a gata 16 foi utilizada duas vezes com intervalo de 4 meses, totalizando 20 induções de estro. Fêmeas diagnosticadas prenhes antes da indução do estro ou apresentando alteração no estado de saúde foram descartadas do projeto. Após 112 a 115 horas da aplicação do eCG, durante a laparotomia para a técnica de IAIU, foi observado que duas gatas (gatas 4 e 21) apresentavam apenas folículos menores que 2 mm de diâmetro em ambos os ovários e citologia vaginal não característica de estro. Para a técnica de IAIV, todas as gatas no momento da IA (112 a 115 horas após administração do eCG) apresentavam citologia vaginal característica de estro e foram consideradas em cio. A gata 21 foi descartada por apresentar alterações no estado de saúde, observado após indução do estro. Desta forma, das 19 induções de estro válidas apenas uma não foi bem sucedida, resultando em um índice de 94,7%.

Todas as gatas submetidas à técnica de IAIU apresentaram corpos hemorrágicos em ambos os ovários no momento da laparotomia para a IA, ou seja, todas foram inseminadas após a ovulação. Os valores de progesterona sérica no momento da IA ficaram abaixo de 1,5 ng/ mL, ou seja, as gatas quando induzidas com eCG se encontravam, provavelmente, na fase de interestro ou anestro. Todas as dosagens de progesterona sérica após 18 a 21 dias da IA resultaram em valores superiores a 1,5 ng/ mL, confirmando ovulação em 100% das fêmeas após administração do hCG. Os resultados da dosagem de progesterona se encontram no Anexo 4.

As gatas 9 e 27, ambas utilizadas para a técnica de IAIU (gata 9 inseminada com gato B e gata 27 com o gato A), foram diagnosticadas com piometra após 18 a 20 dias da IA e submetidas à OSH e ao tratamento clínico específico para o caso. As gatas 9 e 27 apresentaram 28 e 26 CLs em ambos os ovários, respectivamente, e nenhum cisto folicular. Essas gatas foram descartadas do experimento e as inseminações repetidas em outras fêmeas.

O número de CLs e folículos entre 2 a 5 mm e superiores a 5 mm de diâmetro encontrados nos ovários das gatas após 18 a 20 dias (n=14) da IA estão na Tabela 6 (Figura 12).

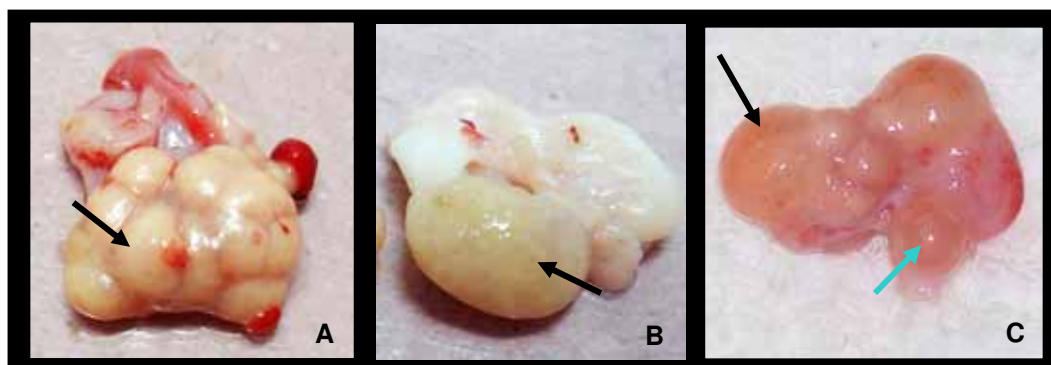


FIGURA 12. Ovários de gata doméstica após 18 a 21 dias da IA, sendo: A) ovário contendo vários CLs (seta) em sua superfície; B) ovário apresentando apenas folículos de até 2 mm de diâmetro (seta); C) ovários apresentando CLs (seta branca), folículos de até 5 mm de diâmetro (seta azul) e folículos maiores que 5 mm (seta preta).

TABELA 6. Quantidade de corpos lúteos (CL) e folículos ovarianos entre 2 a 5 mm e superiores a 5 mm de diâmetro, Botucatu, 2007.

Gata	CL	Folículos de 2 a 5 mm de diâmetro	Folículos acima de 5 mm de diâmetro	Número total de folículos
13	22	1	3	4
15	20	7	0	7
30	19	0	0	0
3	20	5	2	7
8	22	0	0	0
28	27	0	0	0
29	19	2	1	3
11	37	1	2	3
12	32	4	1	4
14	18	0	0	0
19	35	3	0	3
24	33	3	0	3
25	14	1	0	1
26	15	4	0	4
Média	23,8 ± 7,6	2,2 ± 2,2	0,6 ± 1,0	2,8 ± 2,4

3. Resultados da inseminação artificial

Os resultados de prenhez e o número de vesículas embrionárias observados com 18 a 21 dias após a realização das IA (Figura 13), assim como, a dose inseminante e as características das amostras de sêmen utilizadas em cada inseminação se encontram na Tabela 7.

TABELA 7. Resultado de prenhez para cada fêmea utilizada nos métodos de IAIU ou IAIV e número de vesículas embrionárias observadas com 18 a 21 dias após IA, dose inseminante e características das amostras seminais em cada inseminação, Botucatu, 2007.

Método	Gato	Gata	R	V	Sptz total (10 ⁶)	Sptz móveis (10 ⁶)	MT (%)	MP (%)	IMP (%)	AN (%)	PN (%)
IU	A	13	+	4	72,0	33,1	46	26	48	61,5	40
		15	+	3	75,4	42,2	56	36	44	64	40
		16	+	2	68,2	35,5	52	37	49	61	41
		30	+	1	78,7	42,5	54	32	46	60,5	41
	B	8	+	1	74,0	45,9	62	38	48	54,5	39
		28	+	1	70,9	25,5	36	22	45	62,5	36
		3	-	0	77,8	42,8	55	32	52	58	35
		29	-	0	75,1	36,0	48	29	42	45,5	34,5
IV	A	11	-	0	71,6	35,1	49	28	46	46,5	37,5
		12	-	0	79,2	42,0	53	30	42	57,5	40,5
		14	-	0	71,0	42,6	60	40	42	53	42,5
		16	-	0	75,8	43,2	57	41	43	56	37,5
	B	19	-	0	68,9	42,0	61	39	38	43	35,5
		24	-	0	78,2	41,4	53	31	43	52	36
		25	-	0	73,9	43,6	59	37	49	53	31
		26	-	0	73,8	32,5	44	28	41	49,5	37
Média				2,0 (± 1,3)	74,0 (± 3,4)	39,1 (± 5,5)	52,8 (± 6,9)	32,9 (± 5,6)	44,9 (± 3,7)	54,9 (± 6,4)	37,8 (± 3,0)

R (resultado de prenhez após 18 a 21 dias da IA); V (número de vesículas observadas após 18 a 21 dias da IA); Sptz totais (número total de espermatozoides na dose inseminante); Sptz móveis (número total de espermatozoides móveis na dose inseminante); MT (motilidade total); MP (motilidade progressiva); IMP (porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra); AN (porcentagem de acrossomos normais) e PN (porcentagem de espermatozoides morfolologicamente normais).



FIGURA 13. Imagem ultra-sonográfica do útero de gata doméstica gestante com visualização das vesículas embrionárias após 18 dias da IA.

Para o gato A foi obtido 100% de prenhez com o método de IAIU e de 0% com o método de IAIV. Já para o gato B, uma taxa de prenhez de 50% foi obtida com o método de IAIU e de 0% após IAIV. No total, para os dois machos, foram observadas taxas de 75% de fêmeas prenhes após a IAIU e de 0% após o método de IAIV.

O teste exato de Fisher, quando aplicado as variáveis método e resultado de IA, produz um nível descritivo (valor p) de aproximadamente 0,007, fornecendo evidência de que as duas variáveis são associadas. Um intervalo de confiança para a razão de chances tem limites (2,11; infinito), possibilitando concluir que a chance de resultado positivo para o método IAIU é no mínimo 2,11 vezes superior à chance de resultado positivo para o método IAIV, com 95% de confiança.

A gata 16 pariu dois filhotes saudáveis, um macho e uma fêmea, após 65 dias da IAIU.

Discussão

DISCUSSÃO

Para a congelação das células espermáticas dos gatos domésticos existem diversos protocolos, os quais apresentam diferenças na constituição do diluente, tempo de refrigeração, momento de glicerolização, taxa de refrigeração e congelação, temperatura de descongelação, entre outras. Da mesma forma, os métodos de avaliação das células espermáticas também diferem entre os estudos, sendo assim, é difícil uma comparação fidedigna dos resultados obtidos após descongelação do sêmen entre os diversos pesquisadores.

Pukazhenth et al. (1999) observaram maior perda da integridade do acrossomo após utilização de taxas rápidas de refrigeração ($4^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ou $14^{\circ}\text{C}/\text{min}$) e menor perda com uma taxa de refrigeração mais lenta ($0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$). Apesar disso, Zambelli et al. (2002) utilizando diluente com glicerol e uma taxa de refrigeração de $12^{\circ}\text{C}/\text{min}$, previamente a congelação, não encontraram perda na motilidade espermática e nem na integridade do acrossomo após o período de equilíbrio. Assim, pode-se especular que os efeitos deletérios das taxas de refrigeração mais rápidas podem ser minimizados pela adição do glicerol ao diluente. No presente estudo, a glicerolização foi realizada previamente a refrigeração com taxa de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$, contudo as amostras de sêmen não foram avaliadas após o tempo de equilíbrio para se determinar os efeitos da refrigeração sobre as células espermáticas, somente após descongelação.

Após refrigeração com glicerol a uma taxa de $0,2^{\circ}\text{C}/\text{min}$, Tebet et al. (2006) observaram 28,3% de acrossomos lesados e 51% de espermatozóides com membrana plasmática íntegra nas amostras após descongelação, sendo estes valores superiores quando comparados aos encontrados no presente trabalho (45,1% e 44,9%, respectivamente). Contudo, através da técnica de microscopia eletrônica, Tebet et al. (2006) notaram que a maioria das células espermáticas avaliadas apresentava lesões acrossomais.

Segundo Zambelli et al. (2002), taxas de congelação mais lentas (3,85°C/ min) são importantes para a preservação da motilidade e da integridade do acrossomo nos espermatozóides dos gatos domésticos. Neste estudo, utilizando-se uma taxa média de 14°C/ min para a congelação obteve-se uma porcentagem de motilidade espermática semelhante e uma porcentagem de acrossomos intactos inferior aos valores observados por Zambelli et al. (2002) (52,9% vs 49,7% e 54,9% vs 66%, respectivamente) utilizando taxa de 9°C/ min. Wood et al. (1993), com uma taxa de congelação rápida (40°C/ min), encontraram uma perda de 72% da integridade acrossomal, corroborando com os dados obtidos por Zambelli et al. (2002) quando também utilizaram taxas rápidas de congelação (36 ou 43°C/ min). É importante frisar que, apesar de Zambelli et al. (2002) terem encontrado melhores resultados de motilidade e integridade de acrossomo utilizando a taxa de 3,85°C/ min, a avaliação da integridade de membrana plasmática seria recomendável, uma vez que, embora altos índices de integridade de acrossomo sejam observados, uma queda acentuada da integridade da membrana plasmática após a descongelação pode ocorrer (TEBET et al., 2006).

A presença do plasma seminal, embora implicada na redução da longevidade das células espermáticas dos gatos (McLAUGHLIN & HAMNER, 1974), não mostrou interferência nos resultados após o processo de refrigeração por tempo prolongado (HARRIS et al., 2001). Não existe nenhum estudo em gatos que avalie a ação do plasma seminal no processo de congelação, na longevidade do sêmen descongelado e na IA. Embora a maioria dos trabalhos realize a retirada do plasma seminal previamente a congelação, esse procedimento não foi possível no presente estudo. Por ser necessária uma centrifugação previa a IA, para reduzir o volume de inseminação, e pelo sêmen do gato ser muito sensível ao procedimento de centrifugação, optou-se por realizar apenas uma centrifugação após a descongelação do sêmen. Tsutsui et al. (2000b) também utilizaram a centrifugação apenas após descongelação do sêmen pelo mesmo motivo e observaram menor motilidade (30%) e maior viabilidade (51,9%) quando comparados com nossos resultados (52,8% e 44,9%, respectivamente), embora métodos diferentes de avaliação da motilidade e da integridade da membrana plasmática tenham sido utilizados.

Axnèr et al. (2004) demonstraram que a adição do Equex STM, um detergente a base de SDS, ao diluente de congelação para espermatozóides epididimais de gato, apesar de aumentar a integridade do acrossomo (de 19,9% para 34,6% após a congelação/descongelação), levou há uma redução da longevidade espermática *in vitro* após a descongelação. Em contrapartida, para o sêmen de cães, Peña et al. (2004) observaram que a adição do Equex STM Paste ao diluente promoveu, após descongelação, melhor conservação da integridade da membrana plasmática e do acrossomo e maior motilidade após 7 horas de incubação quando comparado ao controle, sem a adição do SDS. Apesar do possível efeito deletério à longevidade das células espermática, o OEP, um detergente também à base de SDS e utilizado neste trabalho para a congelação do sêmen, não influenciou na capacidade de fertilização das células espermáticas, embora possa ser, em parte, responsabilizado pelo baixo resultado de fertilidade após a IAIV por talvez contribuir com a redução da longevidade dessas células.

Após a descongelação, além da grande quantidade de lesão acrossomal contribuindo para o aumento na porcentagem de espermatozóides com defeitos maiores, também se observou um aumento na quantidade de defeitos maiores de cauda (cauda fortemente dobrada ou enrolada) e de defeitos na peça intermediária. Ao contrário do observado neste trabalho, Axnèr et al. (2004) não verificaram diferenças na morfologia espermática antes e após a congelação/descongelação, contudo, estes autores consideraram apenas os espermatozóides que apresentavam acrossomos e membrana plasmática íntegros.

O aumento na porcentagem de caudas dobradas ou enroladas, observado neste estudo após a descongelação, pode ser consequência das alterações induzidas pelo processo de congelação/descongelação (WATSON, 1995) ou por alterações na osmolalidade, uma vez que as células espermáticas dos felinos são muito sensíveis às diferenças osmóticas (PUKAZHENTHI et al., 2000). Ainda, existe a possibilidade dos defeitos de cauda terem sido causados pelo método de coloração utilizado neste trabalho, pois a amostra de sêmen após a descongelação, contendo alta osmolalidade, foi diluída diretamente em um meio tampão de citrato de sódio a 2,9%, de baixa osmolalidade (290 mOsm/ Kg). Desta forma, para a avaliação da morfologia do sêmen

descongelado, talvez a utilização de preparações úmidas seja mais apropriada, usando as técnicas de coloração apenas para visualização do acrossomo.

A respeito da motilidade espermática, nós observamos uma queda nas porcentagens dessa variável após a descongelação para as amostras de ambos os gatos. Essa diminuição na porcentagem de espermatozóides móveis pode ser devido às mudanças na osmolalidade, no transporte ativo e na permeabilidade da membrana plasmática na região da cauda, combinadas a uma alteração na disponibilidade de energia e/ou danos nos elementos do axonema (Watson, 1995).

O método de avaliação da motilidade espermática pelo sistema de CASA tem se mostrado valioso para o diagnóstico de infertilidade em clínicas de reprodução humana, realizando uma análise objetiva (VERSTEGEN et al., 2002). Milligan et al. (1980) observaram que, baseando-se nas medidas de velocidade espermática, homens férteis e inférteis podem ser diferenciados. Em bovinos, a combinação da porcentagem de motilidade e velocidade apresentou alta correlação com a fertilidade (FARRELL et al., 1998).

Embora algumas características espermáticas sejam importantes para a fertilidade dos espermatozóides, ainda não está claro quais características do movimento espermático, avaliados pelo CASA, são de valor clínico para prever a fertilidade (MILLIGAN et al., 1980; MANN, 1989). Uma correlação positiva entre o número total de espermatozóides móveis inseminados, VCL e fecundidade foi observada (GERRIS & KHAN, 1987; BYRD et al., 1990). Os valores de VCL também foram correlacionados com o sucesso na FIV (HOLT et al., 1994). Os valores de ALH dos espermatozóides selecionados pela técnica de *swim-up* correlacionaram-se positivamente com as taxas de fertilidade (LIU et al., 1991; SUKCHAROEN et al., 1995; JEULIN et al., 1996). O BCF não mostrou ter efeito sobre as taxas de FIV em alguns estudos (DONNELLY et al., 1998; DONNELLY et al., 2000), contudo em outros uma correlação positiva foi encontrada (SUKCHAROEN et al., 1995; SUKCHAROEN et al., 1998). Devido ao fato da LIN ser a proporção de VSL por VCL, e sendo esta correlacionada negativamente com a taxa de FIV, a amostra de sêmen infértil pode tender a apresentar uma proporção alta de VSL para VCL (VERSTEGEN et al., 2002).

Para os gatos domésticos, não há nenhum estudo correlacionando os valores obtidos pela análise de CASA e a fertilidade *in vitro* ou *in vivo*. Neste estudo, os dois gatos utilizados obtiveram valores similares em quase todas as variáveis analisadas pelo CASA após a descongelação, com exceção dos valores de BCF, LIN e ALH, sendo os dois primeiros maiores para o gato A e o último maior para o gato B. O gato A apresentou melhor fertilidade após IAUI, com 100% de prenhez, comparado ao gato B, com apenas 50% de prenhez, contudo, devido ao baixo número de gatas inseminadas pelo método intra-uterino para cada gato (n=4) e às semelhanças entre as amostras dos gatos após descongelação, fica difícil correlacionar a fertilidade *in vivo* com os valores obtidos pela análise do CASA.

Diferente do encontrado neste trabalho, Stachecki et al. (1994), trabalhando com sêmen do epidídimo, encontraram uma redução nos valores de ALH após a descongelação. Os valores de ALH se relacionam ao movimento de hiperativação, característico dos espermatozóides que passam pelo processo de capacitação ou por alterações parecidas a capacitação induzidas, por exemplo, pelos procedimentos de refrigeração e congelação/descongelação (GREEN & FISHEL, 1999). Desta forma, o aumento nos valores de ALH após a descongelação, observado neste estudo, pode estar relacionado à hiperativação dos espermatozóides induzida pelo processo de congelação/descongelação.

A integridade da membrana plasmática, além de ser importante para a sobrevivência dos espermatozóides no trato reprodutivo da fêmea, é também fundamental para a manutenção da capacidade fertilizante das células espermáticas (PARKS & GRAHAM, 1992). A desestabilização das membranas espermáticas pela criopreservação pode levar a uma reação acrossomal prematura, reduzindo a longevidade dos espermatozóides e sua capacidade de fecundação. Adicionalmente, a ocorrência de uma falsa reação acrossomal é também descrita para o sêmen descongelado, quando as alterações acrossomais estão associadas a lesões irreversíveis das membranas (BEDFORD, 1970; MEIZEL, 1978). Atualmente, as sondas fluorescentes vêm ocupando um papel importante na avaliação das membranas espermáticas, auxiliando na análise *in vitro* dessas células.

A coloração utilizando as três sondas fluorescentes; IP, JC-1 e PSA permite avaliar a integridade das membranas plasmática e acrossomal e o potencial mitocondrial ao mesmo tempo. Infelizmente, devido ao número pequeno de amostras de sêmen avaliadas para cada gato (n=3), não foi possível realizar a comparação dos resultados obtidos entre os dois machos utilizados neste trabalho.

O IP possui afinidade ao DNA, corando em vermelho o núcleo das células que apresentam membrana plasmática lesada, e por ser um corante estável é utilizado com êxito na microscopia de epifluorescência e na citometria de fluxo (GARNER et al., 1986; GARNER et al., 1988; HARRISON & VICKERS, 1990; MAXWELL et al., 1997).

O PSA, uma aglutinina derivada da ervilha (*Pisum sativum*), possui especificidade às glicoproteínas e se liga especificamente ao açúcar α -manosidase, encontrado no conteúdo acrossomal (CROSS et al., 1986), não penetrando em membranas acrossomais intactas. Para a visualização do acrossomo espermático em microscopia de epifluorescência, o PSA é conjugado a fluoresceínas como o isotiocionato de fluoresceína (FITC) (FARLIN et al., 1992), desta forma marcando com sucesso o acrossomo espermático em verde amarelado quando as membranas acrossomais estão lesadas (CROSS et al., 1986; GRAHAM et al., 1990; FARLIN et al., 1992; CASEY et al., 1993).

Para os bovinos, comparando-se o PSA ao amarelo de naftol/ eritrosina B foram observados 6% a mais de acrossomos danificados identificados pela coloração com o PSA (GRAHAM et al., 1990). Adicionalmente, Farlin et al (1992) encontraram correlação entre a porcentagem de espermatozóides de eqüinos ligados ao PSA e a proporção de espermatozóides com acrossomo danificado nas amostras. Em gatos, o PNA, também uma aglutinina, tem sido utilizado com sucesso na detecção de lesões acrossomais (PUKAZHENTHI et al., 1999; PUKAZHENTHI et al., 2001; AXNÈR et al., 2004).

Após comparação entre os resultados obtidos neste estudo com a coloração de PSA e com a técnica descrita por Pope et al. (1991a), foi observada maior porcentagem de acrossomos danificados utilizando o segundo método. Apesar da técnica utilizando o PSA oferecer boa visualização do acrossomo danificado, da mesma forma que na técnica de Pope et al. (1991a),

a leitura é subjetiva, podendo levar a variações entre os examinadores. Para a validação de uma técnica de detecção da lesão acrossomal, o mais indicado é correlacioná-la a microscopia eletrônica (CROSS & MEIZEL, 1989).

A sonda fluorescente JC-1 é utilizada para identificar diferenças no potencial das membranas mitocondriais, alterando sua cor do verde ao laranja ou vermelho de acordo com o aumento do potencial (REERS et al., 1991; COSSARIZZA et al., 1993). A fluorescência verde do JC-1 ocorre devido à formação de monômeros, apresentando excitação e emissão máxima de 510 a 527 nm, respectivamente, enquanto a fluorescência vermelha é devido à formação de J-agregados, com excitação e emissão máxima de 485 a 585 nm, respectivamente (HAUGLAND, 2001 apud CELEGHINI, 2005).

Correlação entre motilidade e espermatozóides com alto potencial de mitocôndria, corados com JC-1, foi encontrada apenas antes da congelação do sêmen em bovinos (THOMAS et al., 1998). Nessa espécie, também foi observado que o glicerol pode diminuir o potencial da membrana mitocondrial devido à redução de J-agregados nos espermatozóides corados por JC-1 (GARNER et al., 1999). Garner et al. (1997) declararam que o JC-1 não permite boa distinção entre espermatozóides com baixa ou alta funcionalidade mitocondrial. Já para os gatos domésticos, não existe relato anterior de utilização dessa sonda fluorescente na avaliação do sêmen. Neste estudo, foi observada uma pequena porcentagem de mitocôndrias com alto potencial de mitocôndria para ambos os animais avaliados (18,0 e 15,7%) após a descongelação, ficando bem abaixo dos valores encontrados para a motilidade total (53,4 e 52,3%) e motilidade progressiva (33,8 e 32,0%). Em nosso laboratório, testes preliminares utilizando o JC-1, realizados com sêmen fresco, demonstraram grande quantidade de espermatozóides apresentando alto potencial de mitocôndria.

No presente estudo, o sucesso na indução do crescimento folicular nos ovários, observado durante a laparotomia ou através do exame de citologia vaginal no momento da IA, foi de 94,7% (18 de 19) após a administração de 100 UI de eCG. Esse valor é próximo a taxa encontrada por Howard et al (1992), que obtiveram 98,1% (53 de 54) de fêmeas com crescimento folicular após a mesma dose de eCG.

Adicionalmente, obtivemos uma taxa de 100% de fêmeas que responderam à indução da ovulação após administração de 100 UI de hCG, sendo similar a taxa encontrada por Howard et al. (1992) com a mesma dose de hCG e estro induzido através do eCG. Entretanto, Tsutsui et al. (2000ab), utilizando fêmeas em estro natural e duas aplicações de 100 UI de hCG com intervalo de 24 horas, obtiveram taxas de ovulação ligeiramente menores (95,5% e 82,4%). Com base nesses resultados, é importante observar que quantidades pequenas de hCG (100 UI) são suficientes para obter-se sucesso na indução da ovulação e, desta forma, reduzir os efeitos colaterais da terapia com as gonadotrofinas exógenas (GOODROWE et al., 1988b; GRAHAM et al., 2000).

Após 6 a 7 dias da IA, foram encontrados em média de $27,2 \pm 5,6$ (ROTH et al., 1997) e $18,9 \pm 3,3$ (HOWARD et al., 1992) CLs quando as induções do estro e da ovulação foram realizadas com eCG e hCG. Esses valores estão próximos ao observado neste trabalho após 18 a 21 dias da IA, $23,8 \pm 7,6$ CLs. Howard et al. (1992) e Goodrowe et al. (1988a) observaram um aumento na quantidade de CLs quando compararam os números obtidos antes e após 6 a 7 dias da IA ou aspiração folicular. Esse achado pode ser resultado da ovulação de folículos provenientes de uma segunda onda folicular desencadeada pela utilização das gonadotrofinas exógenas. No presente estudo, o número de folículos ou CLs não foram anotados no momento da IA, assim não podemos concluir se houve ou não um aumento no número de CLs.

É importante ressaltar que é comum o achado de folículos acima de 2 mm de diâmetro em gatas submetidas aos protocolos com eCG e hCG após 6 dias da IA [$5,3 \pm 1,6$ (HOWARD et al., 1992); $8,7 \pm 1,5$ (ROTH et al., 1997)]. Esses folículos podem ser originados de uma segunda onda folicular estimulada pelas gonadotrofinas exógenas, chamados de folículos ancilários (SWANSON et al., 1996a) ou serem resultado de folículos que falharam no processo de ovulação e formaram cistos (WILDT et al., 1978). Neste trabalho encontrou-se um total de $2,8 \pm 2,4$ folículos acima de 2 mm de diâmetro sendo: $2,2 \pm 2,2$ entre 2 a 5 mm de diâmetro e $0,6 \pm 1,0$ acima de 5 mm. Esses valores embora menores quando comparados a outros trabalhos (HOWARD et al. 1992; ROTH et al. 1997), foram obtidos após 18 a 21 da IA, ou seja, em momento diferente quando comparado aos demais trabalhos, com 6 dias da IA.

Desta forma, os folículos menores que 5 mm, classificados como folículos pré-ovulatórios, podem ser resultado do crescimento folicular fisiológico que ocorre em gatas prenhes ou em pseudo-gestação (VERHAGE et al., 1976; WILDT et al., 1981). Já os folículos acima de 5 mm de diâmetro, considerados de aparência cística, podem ser folículos da primeira ou segunda onda folicular as quais foram induzidas pelas gonadotrofinas exógenas, que falharam no processo de ovulação e não regrediram.

Durante a IA foi observada a presença de corpos hemorrágicos em todas as gatas submetidas ao procedimento de IAIU e com dosagem de progesterona abaixo de 1,5 ng/ mL no momento da IA, indicando que estas fêmeas haviam ovulado num período anterior a 30-31 horas da aplicação do hCG, estando de acordo com trabalhos anteriores (SOJKA et al., 1970; SHILLE et al., 1983). Howard et al. (1992) observaram a ocorrência de ovulações a partir de 31 horas após a indução com hCG. Por sua vez, Tsutsui et al. (2000a) verificaram ovulações num período a partir de 15 horas após a indução com hCG em fêmeas com estro natural, sugerindo grande variação individual.

Em seu trabalho, Howard et al. (1992) além de observarem uma interferência importante da anestesia sobre o processo de ovulação também notaram que, quando a IA foi realizada previamente a ovulação, o índice de prenhez foi menor (14,3%) comparado ao obtido com a IA após a ovulação (50%), utilizando sêmen fresco e IAIU. Por outro lado, Tsutsui et al. (2000a), também utilizando sêmen fresco e IAIU, observaram maior índice de prenhez quando a IA foi realizada antes da ovulação. Em outro trabalho com IAIU e sêmen descongelado, Tsutsui et al. (2000b) obtiveram menores taxas de ovulação (82,4%) e de prenhez (57,1%) quando comparadas com as taxas de ovulação (100%) e de prenhez (75%) encontradas em nosso trabalho, com IA após ovulação, embora tenhamos usado uma dose inseminante maior. Com base nesses achados, é importante observar que em alguns casos uma interferência da anestesia sobre o processo de ovulação pode realmente ocorrer, e que quando se trabalha com sêmen descongelado talvez seja melhor a realização da IA logo após a ovulação, uma vez que estas células espermáticas apresentam menor longevidade.

Após 20 dias da IAIU, foram diagnosticados dois casos de piometra em duas gatas inseminadas, sendo uma com o gato A e outra com o gato B. O

cultivo do conteúdo uterino revelou a presença de *Escherichia coli* β -hemolítica, sendo que essa bactéria não foi isolada quando realizado o cultivo das amostras de sêmen descongelado dos gatos utilizados. Todo o material usado para o procedimento da IAIU era estéril e aberto apenas no momento do uso, sendo o catéter de inseminação descartado logo após utilização. As gatas não apresentaram alterações visíveis no útero durante o procedimento de IAIU e apenas uma delas tinha histórico de aplicação de anticoncepcional há cinco meses atrás. A dosagem de progesterona após 20 dias da IA foi de 13,9 ng/mL para a gata 9 e de 8,0 ng/mL para a gata 27, estando estes valores dentro dos resultados encontrados para as demais gatas utilizadas neste trabalho. Uma explicação plausível para o fato seria que estas gatas já apresentavam algum grau de hiperplasia cística do endométrio, que pode ter sido agravada pelo uso das gonadotrofinas exógenas, e com a abertura da cérvix durante o estro uma contaminação ascendente pode ter ocorrido, uma vez que a *Escherichia coli* é freqüentemente isolada da vagina de gatas saudáveis (CLEMETSON & WARD, 1990). Apesar de não se conhecer a real participação das gonadotrofinas exógenas nesse processo, faz-se necessário o uso criterioso dessa terapia em animais de alto valor genético.

Para a IAIU foi observado que uma dose inseminante de 8×10^6 de espermatozóides móveis é suficiente para se obter um índice de 77,8% de prenhez com o sêmen fresco (TSUTSUI et al., 2000a). Já para o sêmen descongelado, Tsutsui et al. (2000b) obtiveram uma taxa de 57,1% utilizando em média $12,5 \times 10^6$ de espermatozóides móveis e inseminação unilateral. Em nosso trabalho, utilizando em média $39,1 \pm 5,5 \times 10^6$ de espermatozóides móveis, divididos entre os dois cornos uterinos, obtivemos uma taxa de 75% de prenhez. Embora seja difícil a comparação entre os dois estudos devido a diferenças de metodologia entre ambos [momento da IA, dose de hCG, tipo de estro (natural ou induzido)], podemos notar que a dose inseminante de aproximadamente 40×10^6 de espermatozóides móveis foi mais apropriada, uma vez que proporcionou melhor taxa de prenhez. Contudo, além da diferença entre as doses de inseminação, outro fator que pode ter contribuído para melhorar o índice de prenhez foi a realização da IA nos dois cornos uterinos. Tsutsui et al. (2000b) ao trabalhar com sêmen descongelado notaram que, quando depositados somente em um corno uterino, os espermatozóides

não têm a capacidade de colonizar o corno uterino adjacente e, conseqüentemente, fecundar os oócitos contra-laterais.

No método de IAIV a utilização de uma dose inseminante de 80×10^6 de espermatozóides móveis proporcionou um índice de 80% de prenhez com o sêmen fresco (TANAKA et al., 2000b). Em contrapartida, usando também sêmen fresco, Sojka et al. (1970) obtiveram uma taxa de prenhez de 75% utilizando apenas 5×10^6 de espermatozóides móveis em duas inseminações com intervalo de 24 horas. Já para o sêmen descongelado, uma taxa de 10,6% de prenhez foi obtida após duas inseminações, com intervalo de 24 horas, usando de 50 a 100×10^6 de espermatozóides móveis, sendo que em 83% das prenhezes foram utilizados apenas 50×10^6 de espermatozóides móveis por inseminação. No presente estudo, utilizando uma dose inseminante de aproximadamente 40×10^6 de espermatozóides móveis por via intra-vaginal, não obtivemos nenhuma prenhez. Quando Tanaka et al. (2000b) utilizaram dose inseminante semelhante, porém com sêmen fresco, obtiveram uma taxa de 33,3% de prenhez.

Existem vários fatores que podem ter contribuído para esse baixo sucesso após a IAIV com sêmen descongelado como; menor longevidade das células descongeladas, barreira da cérvix aos espermatozóides anormais e com baixa motilidade e interferência da anestesia sobre o transporte espermático.

Com relação ao local de inseminação no fundo vaginal, utilizamos uma sonda de aproximadamente 1,3 mm de diâmetro, a qual foi introduzida de 30 a 40 mm no interior da vagina. Nos trabalhos desenvolvidos por Sojka et al. (1970) e Platz et al. (1978), não fica claro o local de posicionamento da sonda de inseminação no interior da vagina. Já Tanaka et al. (2000b), utilizando uma sonda de 1,5 mm de diâmetro, também conseguiram posicioná-la de 30 a 40 mm no interior da vagina, com a diferença de que estes utilizaram um extensor de 2 mm de diâmetro para o istmo da vagina, o que, segundo os autores, evitou o refluxo do sêmen. Mesmo utilizando volume de sêmen semelhante à Tanaka et al. (2000b) (100µL), nós observamos um refluxo pequeno em alguns casos. Vale ressaltar que, enquanto a inseminação entre 30 a 40 mm no interior da vagina apresenta resultado positivo com sêmen fresco, o mesmo não ocorreu com o sêmen descongelado. Desta forma, pode-se postular que o

local de inseminação no interior da vagina não é o único fator que contribui para o baixo sucesso de prenhez utilizando sêmen descongelado na IAIV.

Em tigresas anestesiadas para o procedimento de IAIV, observou-se uma queda no transporte dos espermatozóides no interior do útero, sugerindo que a anestesia pode reduzir a motilidade uterina e comprometer a habilidade do espermatozóide em atingir o local de fertilização (WILDT et al., 1987). Embora existam indícios de que não haja interferência da anestesia no transporte espermático pelo trato reprodutivo da gata (TANAKA et al., 2000b), não existe nenhum estudo determinando a real influência da anestesia. No entanto, deve-se levar em consideração que a anestesia é muito importante para o procedimento IAIV, uma vez que permite melhor posicionamento da sonda de inseminação, sendo também indispensável quando se pensa na utilização dessa técnica de inseminação em felinos selvagens.

Em animais como os coelhos, a fase rápida do transporte espermático é considerada um processo passivo, causada por contrações vaginais e uterinas que podem ser bloqueadas por antagonistas adrenergéticos (OVERSTREET & TOM, 1982). Em gatas domésticas, observou-se que, após 30 minutos da monta natural, 1,3 % dos espermatozóides já se encontravam na tuba uterina (CHATDARONG et al., 2004). Embora se conheça pouco a respeito do processo de transporte espermático nas gatas, talvez a monta natural, da mesma forma que é importante para desencadear a reação pós-coito, possa também ter um papel importante na estimulação da contratilidade do trato reprodutivo, auxiliando no transporte rápido dos espermatozóides. Corroborando com esse fato, podemos destacar que os índices de fertilidade são maiores após a monta natural (87,5% - SWANSON et al., 1994) quando comparada à IAIV, mesmo utilizando sêmen fresco com alta concentração (TANAKA et al., 2000b). Desta forma, embora a anestesia possa influenciar a motilidade do trato reprodutivo da gata, possivelmente, a ausência do estímulo do coito no processo de IA seja um dos responsáveis pela redução do transporte espermático até a tuba uterina, e conseqüente atraso no processo de fertilização, o qual é mais prejudicial ao sêmen descongelado devido a sua menor longevidade.

Não obstante, quando o sêmen é depositado no fundo de vagina, existe mais uma barreira a ser transposta, a cérvix, que assim como suas secreções,

tem um importante papel de filtração, prevenindo que espermatozóides morfolologicamente anormais possam chegar ao local de fertilização (FREUNDL et al., 1988). Após a monta natural, foi observado que aproximadamente 70% do sêmen permanece retido na vagina das gatas domésticas (CHATDARONG et al., 2004). Deve-se atentar ao fato de que o sêmen descongelado, quando comparado às amostras previamente a congelação, apresenta grande perda de sua qualidade, com alterações nos padrões de movimento, como queda na motilidade (total e progressiva) e na velocidade (VSL, VAP e VCL). Foi observado que baixos valores de ALH podem afetar negativamente a habilidade do espermatozóide humano em penetrar o muco cervical e de se fundir a zona pelúcida (JEULIN et al., 1986). Uma correlação positiva entre a porcentagem de espermatozóides morfolologicamente anormais e uma redução na motilidade total, VCL, VSL e ALH foi encontrada para os gatos domésticos (STACHECKI et al., 1993). Esse é um fato importante, pois sabe-se que os felinos teratospérmicos apresentam redução nas taxas de fertilização *in vitro* e *in vivo* (HOWARD et al., 1991; WILDT et al., 1992).

Desta forma, devido ao fato dos espermatozóides morfolologicamente anormais terem sua capacidade de migração pelo trato da fêmea comprometido e de muitos felinos ejacular em relativamente baixas concentrações de espermatozóides e relativamente alta quantidade de formas anormais com função espermática comprometida (WILDT et al., 1983; HOWARD et al., 1984; HOWARD et al., 1990; HOWARD et al., 1991), transpor a barreira cervical, sem dúvida, coloca uma quantidade maior de espermatozóides próximos ao local de inseminação, aumentando a chance de sucesso na fecundação.

A taxa de fecundação dos oócitos (número de embriões/ número de CLs) após IAIU com sêmen descongelado se mostrou inferior (47,6%) (TSUTSUI et al., 2000b) quando comparada à taxa com sêmen fresco (80%) (TSUTSUI et al., 2000a), proporcionando também uma menor quantidade de fetos [$1,67 \pm 1,2$ (TSUTSUI et al., 2000b) versus $2,9 \pm 1,4$ (TSUTSUI et al., 2000a)] em fêmeas com estro natural. Em nosso trabalho, obtivemos um índice de $2,0 \pm 1,3$ embriões por fêmeas, que apesar de ligeiramente superior ao índice de Tsutsui et al. (2000b), foi inferior ao número obtido com sêmen fresco (TSUTSUI et al., 2000a). Adicionalmente, o número de fetos por fêmea em

nosso trabalho se assemelha ao encontrado por Platz et al. (1978) ($2,0 \pm 1,1$), que trabalharam com fêmeas em estro natural e IAIV com 100 a 200 x 10^6 de espermatozóides totais descongelados, e também ao índice de Howard et al. (1992) ($1,8 \pm 0,3$), que utilizaram IAIU com sêmen fresco e estro induzido com eCG.

É importante destacar que o uso das gonadotrofinas exógenas na indução do estro além de levar a uma hiperestimulação ovariana (GOODROWE et al., 1988b; HOWARD et al., 1992; SWANSON et al., 1996a; GRAHAM et al., 2000) e conseqüente alteração nos perfis hormonais (CHAN et al., 1982; GOODROWE et al., 1988a; ROTH et al., 1997; GRAHAM et al., 2000), também causa uma redução na qualidade dos embriões e atraso no desenvolvimento embrionário, de forma que, aproximadamente, apenas metade dos embriões fertilizados sobrevive aos primeiros estágios do desenvolvimento (HOWARD et al. 1992; ROTH et al., 1997). Assim, o uso do eCG para a indução do estro foi implicado como a causa do baixo sucesso de prenhez e reduzido tamanho da ninhada após IA (HOWARD et al., 1992). Apesar disso, nossos índices de prenhez e de filhotes por ninhada foram ligeiramente melhores que os encontrados por Tsutsui et al. (2000b) que utilizaram gatas em estro natural. Contudo, vale ressaltar que nosso índice de filhotes por ovulação foi bem menor ao encontrado por Tsutsui et al. (2000b).

Neste estudo foi observado o nascimento de dois filhotes saudáveis após 65 dias da IAIU, ficando dentro do período considerado fisiológico para uma gestação, de 62 a 71 dias (média de 66 a 67 dias) (ROOT et al., 1995). Existe uma grande variação no período de gestação de gatas submetidas à IAIU ou à IAIV, com sêmen fresco ou descongelado, entre 62 a 72 dias após IA (SOJKA et al., 1970; PLATZ et al., 1978; HOWARD et al., 1992; TANAKA et al., 2000b; TSUTSUI et al., 2000ab). Acredita-se que maiores períodos de gestação estão relacionados ao uso das gonadotrofinas exógenas para induzir o estro, no entanto, Platz et al., 1978 reportaram o nascimento de filhotes viáveis após 71 dias da IA usando estro natural e gato vasectomizado para induzir a ovulação. Adicionalmente, Tanaka et al, (2000b), utilizando gatas em estro natural, também observaram gestações com até 70 dias de duração.

Conclusão

CONCLUSÃO

Em gatos domésticos, o método de inseminação artificial com deposição do sêmen congelado/descongelado no interior do útero resultou em melhor taxa de prenhez quando comparado ao método de inseminação artificial com deposição do sêmen congelado/descongelado no fundo da vagina.

Bibliografia

BIBLIOGRAFIA

AMANN, R.P. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? **J. Androl.**, v.10, p.89-98, 1989.

ARRIOLA, J.; FOOTE, R.H. Glycerolation and thawing effects on bull spermatozoa frozen in detergent-treated egg yolk and whole egg extenders. **J. Dairy Sci.**, v.70, p.1664-1670, 1987.

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

AXNÈR, E.; LINDE-FOSBERG, C. Semen collection and assessment, and artificial insemination in cat. In: CONCANNON, P.W.; ENGLAND, G.; VERSTAGEN, J.; LINDE-FORBERG. **Recent advances in small animal reproduction**. Ithaca: International Veterinary Information Service. Disponível em: <<http://www.ivis.org>>. Acesso em: 20 agosto 2002.

AXNÈR, E.; HERMANSSON, U.; LINDE-FORSBERG, C. The effect of Equex STM paste and sperm morphology on post-thaw survival of cat epididymal spermatozoa. **Anim. Reprod. Sci.**, v.84, p.179-191, 2004.

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

BANKS, D.H.; STABENFELDT, G.H. Luteinizing hormone release in the cat in response to coitus on consecutive days of estrus. **Biol. Reprod.**, v.26, p.603-611, 1982.

BARAN, A.; BACINOGLU, S.; EVECEN, M.; SAHIN, E. Freezing of cat semen in straws with different glycerol levels containing Tris extender. **Turk. J. Vet. Anim. Sci.**, v.28, p. 545-552, 2004.

BEAVER, B.V. Mating behavior in the cat. **Vet. Clin. North Am.**, v.16, p.729-733, 1977.

BEDFORD, J.M. Sperm capacitation and fertilization in mammals. **Biol. Reprod. Suppl.**, v.2, p.128-158, 1970.

BUFF, S.; DONZÈ, A.; GUERIN, P.; GUILLAUD, J.; FONTBONNE, A.; MENEZO, Y. Taurine and hypotaurine in spermatozoa and epididymal fluid of cats. **J. Reprod. Fert. Suppl.**, v.57, p.93-95, 2001.

BUSSAB, W.O.; MORETTIN, P.A. **Estatística básica**. 5.ed. São Paulo: Editora Saraiva, 2006. 526p.

BYRD, W.; BRADSHAW, K.; CARR, B.; EDMAN, C.; ODOM, J.; ACKERMAN, G. A prospective randomized study of pregnancy rates following intrauterine and intracervical insemination using frozen donor semen. **Fertil. Steril.**, v.53, p.521-527, 1990.

CASEY, P.J.; HILLMAN, R.B.; ROBERTSON, K.R.; YUDIN, A.I.; LIU, I.K.M.; DROBINS, E.Z.; Validation of an acrosomal stain for equine sperm that differentiates between living and dead sperm. **J. Androl.**, v.14, p.289-297, 1993.

CELEGHINI, E.C.C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozóides utilizando sondas fluorescentes**. 2005.

186f. Tese (Doutorado em medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

CHAKRABORTY, P.K.; WILDT, D.E.; SEAGER, S.W.J. Serum luteinizing hormone and ovulatory response to luteinizing hormone releasing hormone in the estrous and anestrous cat. **Lab. Anim. Sci.**, v.29, p.338-344, 1979.

CHAN, S.Y.W.; CHAKRABORTY, P.K.; BASS, E.J.; WILDT, D.E. Ovarian-endocrine-behavioral function in the domestic cat treated with exogenous gonadotropin during mid-gestation. **J. Reprod. Fertil.**, v.65, p.395-399, 1982.

CHATDRONG, K.; LOHACHIT, C.; PONGLOWHAPAM, S.; LINDE-FORSBERG, C. Transcervical catheterization and cervical patency during the estrus cycle in domestic cat. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.57, p.353-356, 2001.

CHATDRONG, K.; KAMPA, N.; AXNER, E.; LINDE-FORSBERG, C. Investigation of cervical patency and uterine appearance in domestic cats. **Reprod. Dom. Anim.**, v.37, p.275-281, 2002.

CHATDRONG, K.; LOHACHIT, C.; LINDE-FORSBERG, C. Distribution of spermatozoa in the female reproductive tract of the domestic cat in relation to ovulation induced by natural mating. **Theriogenology**, v.62, p.1027-1041, 2004.

CITES (1973) Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Flora and Fauna, part of the Endangered Species Act (PL 93-205, 93rd Congress) and in 50 appendices. Code Fed. Reg., part 23.

CLEMETSON, L.L.; WARD, A.C.S. Bacterial flora of the vagina and uterus of healthy cats. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.196, p.902-906, 1990.

CLINE, E.M.; JENNINGS, L.L.; SOJKA, N.J. Breeding laboratory cats during artificially induced estrus. **Lab. Anim. Sci.**, v.30, p.1003-1005, 1980.

CONCANNON, P.W.; HODGSON, B.; LEIN, D. Reflex LH release in estrous cats following single and multiple copulation. **Biol. Reprod.**, v.23, p.111-117, 1980.

COSSARIZZA, A.; BACCARANI-CONTRI, M.; KALASHNIKOVA, G.; FRANCESCHI, C. A new method for the cytometric analysis of mitochondrial membrane potencial using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). **Biochem. Bioph. Res. Co.**, v.197, p.40-45, 1993.

CROSS, N.L.; MORALES, P.; OVERSTREET, J.W.; HANSON, F.W. Two simple methods for detecting – reacted human sperm. **Gamete Res.**, v.15, p.213-226, 1986.

CROSS, N.L.; MEIZEL, S. Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. **Biol. Reprod.**, v.41, p.635-641, 1989.

CUEVA-RÓLON, R.; MUÑOZ-MARTÍNEZ, E.J.; DELGADO-LEZAMA, R.; RAIÁ, J.G. The cat pudendal nerve: afferent fibers responding to mechanical stimulation of the perineal skin, the vagina or the uterine cervix. **Brain Res.**, v.29, p.1-6, 1994.

DAWSON, A.B. Early estrus in the cat following increased illumination. **Endocrinology**, v.28, p.907-910, 1941.

DONNELLY, E.T.; LEWIS, S.E.; MCNALLY, J.A.; THOMPSON, W. *In vitro* fertilization and pregnancy rates: The influence of sperm motility and morphology on IVF outcome. **Fert. Steril.**, v.70, p.305-314, 1998.

DONNELLY, E.T.; McCLURE, N.; LEWIS, S.E. Glutathione and hipotaurine *in vitro*: Effects on human sperm motility, DNA integrity and production of reactive oxygen species. **Mutagenesis**, v.15, p.61-68, 2000.

DONOGHUE, A.M.; JOHNSTON, L.A.; MUNSON, L.; BROWN, J.L.; WILDT, D.E. Influence of gonadotropin treatment interval on follicular maturation, *in vitro*

fertilization, circulating steroid concentrations, and subsequent luteal function in the domestic cat. **Biol. Reprod.**, v.46, p.972-980, 1992.

DOOLEY, M.P.; PINEDA, M.H. Effect of method of collection on seminal characteristics of the domestic cat. **Am. J. Vet. Res.**, v.47, p.286-292, 1986.

DRESSER, B.L.; SEHLHORSET, C.S.; WACHS, K.B.; KELLER, G.L.; GELWICKS, E.J.; TURNER, J.L. Hormonal stimulation and embryo collection in the domestic cat (*Felis catus*). **Theriogenology**, v.28, p.915-927, 1987.

FARLIN, M.E.; JASKO, D.J.; GRAHAM, J.K.; SQUIRES, E.L. Assessment of *Psium sativum* agglutinin in identifying acrossomal damage in stallion spermatozoa. **Mol. Reprod. Dev.**, v.32, p.23-27, 1992.

FARRELL, P.B.; PRESICCE, G.A.; BROCKETT, C.C.; FOOTE, R.H. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. **Theriogenology**, v.49, p.871-879, 1998.

FELDMAN, E.C.; NELSON, R.W. **Canine and Feline Endocrinology and Reproduction**. 2.ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1996. 785p.

FREUNDL, G.; GRIMM, H.J.; HOFMANN, N. Selective filtration of abnormal spermatozoa by the cervical mucus. **Hum. Reprod.**, v.3, p.277-280, 1988.

GARNER, D.L.; PINKEL, D.P.; JOHNSON, L.A.; PACE, M.M. Assessment of spermatozoal function using fluorescent staining and flow cytometric analysis **Biol. Reprod.**, v.34, p.127-138, 1986.

GARNER, D.L.; JOHNSON, L.A.; ALLEN, C.H. Fluorimetric evaluation of criopreserved bovine spermatozoa extended in egg yolk and milk. **Theriogenology**, v.30, p.369-378, 1988.

GARNER, D.L.; THOMAS, A.C.; JOERG, H.W.; DEJARNETTE, J.M.; MARSHALL, C.E. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biol. Reprod.**, v.57, p.1401-1406, 1997.

GARNER, D.L.; THOMAS, A.C.; GRAVANCE, C.G. The effect of glycerol on the viability, mitochondrial function and acrosomal integrity of bovine spermatozoa. **Reprod. Domest. Anim.**, v.34, p.399-404, 1999.

GERRIS, J.; KHAN, I. Correlation between *in vitro* fertilization and human sperm density and motility. **J. Androl.**, v.8, p.48-54, 1987.

GLOVER, T.E.; WATSON, P.F. The effect of buffer osmolality on the survival of cat (*Felis catus*) spermatozoa at 5°C. **Theriogenology**, v.24, p.449-456, 1985.

GLOVER, T.E.; WATSON, P.F. The effects of egg yolk, the low density lipoprotein fraction of egg yolk, and three monosaccharides on the survival of cat (*Felis catus*) spermatozoa stored at 5°C. **Anim. Reprod. Sci.**, v.13, p.229-237, 1987.

GOODROWE, K.L.; WILDT, D.E. Ovarian response to human chorionic gonadotropin or gonadotropin releasing hormone in natural and induced-estrus cats. **Theriogenology**, v.27, p.811-817, 1987.

GOODROWE, K.L.; HOWARD, J.G.; WILDT, D.E. Comparison of embryo recovery, embryo quality, oestradiol-17 β and progesterone profiles in the domestic cats (*Felis catus*) at natural or induced oestrus. **J. Reprod. Fertil.**, v.82, p.553-561, 1988a.

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

GOODROWE, K.L.; HOWARD, J.G.; SCHMIDT, P.M.; WILDT, D.E. Reproductive biology of domestic cat with special reference to endocrinology,

sperm function and *in vitro* fertilization. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.30, p.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.967-975, 1993.

GRAHAM, J.K.; KUNZE, E.; HAMMERSTEDT, R.H. Analysis of sperm cell viability, acrossosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. **Biol. Reprod.**, v.43, p.55-64, 1990.

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.1117-1131, 2000.

GRAHAM, L.H.; SWANSON, W.F.; WILDT, D.E.; BROWN, J.L. Influence of oral melatonin on natural and gonadotropin-induced ovarian function in the cat. **Theriogenology**, v.61, p.1061-1076, 2004.

GREEN, S.; FISHEL, S. Morphology comparison of individually selected hyperactivated and non-hyperactivated human spermatozoa. **Hum. Reprod.**, v.14, p.123-130, 1999.

GUBERMUTH, D.F.; NEWTON, L.; DAELS, P.; CONCANNON, P. Incidence of spontaneous ovulation in young group-housed cats based on serum and faecal concentrations of progesterone. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.51, p.177-184, 1997.

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**, v.55, p.308, 2001.

HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian apermatozoa. **J. Reprod. Fertil.**, v.88, p.343-352, 1990.

HAUGLAND, R.P. Handbook of fluorescent and research chemicals. **Molecular probes**, 2001.

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, p.297-305, 1993.

HERRON, M.A.; SIS, R.F. Ovum transport in the cat and the effect of estrogen administration. **Am. J. Vet. Res.**, v.35, p.1277-1279, 1974.

HOLT, W.; WATSON, P.; CURRY, M.; HOLT, C. Reproducibility of computer-aided semen analysis: comparison of five different systems used in a practical workshop. **Fertil. Steril.**, v.62, p.1277-1282, 1994.

HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v.53, p.47-58, 2000a.

HOLTZ, W.V. Basic aspects of frozen storage semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v.62, p.3-22, 2000b.

HOWARD, J.G.; BUSH, M.; HALL, L.L.; WILDT, D.E. Morphological abnormalities in spermatozoa of 28 species of nondomestic felids. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 10., 1984, Urbana-Champaign. **Proceedings...** Urbana-Champaign, 1984. v.2, p.57-59.

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.204-215, 1990.

HOWARD, J.G.; BUSH, M.; WILDT, D.E. Teratospermia in domestic cats compromises penetration of zona-free hamster ova and cat zonae pellucidae. **J. Androl.**, v.12, p.36-45, 1991.

HOWARD, J.G.; BARONE, M.A.; DONOGHUE, A.M.; WILDT, D.E. The effect of pre-ovulatory anaesthesia on ovulation in laparoscopically inseminated domestic cat. **J. Reprod. Fertil.**, v.96, p.175-186, 1992.

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.390-399.

HURLBUT, S.L.; BOWEN, M.J.; KRAEMER, D.C. The feasibility of transcervical catheterization and nonsurgical embryo collection in the domestic cat. **Theriogenology**, v.29, p.264, 1988.

HURNI, H. Daylength and breeding in the domestic cat. **Lab. Anim.**, v.15, p.229-233, 1981.

JEMMETT, J.E.; EVANS, J.M. A survey of sexual behaviour and reproduction of female cats. **J. Small Anim Pract**, v.18, p.31-37, 1977.

JEULIN, C.; FENEUX, D.; SERRES, C.; JOAUNNER, P.; GUILLET-ROSSO, F.; BELAISCH-ALLART, J.; FRYDMAN, R.; TESTART, J. Sperm factors related to failure of human *in vitro* fertilization. **J. Reprod. Fertil.**, v.76, p.735-744, 1986.

JEULIN, C.; LEWIN, L.M.; CHEVRIER, C.; SCHOEVAERT-BROSSAULT, D. Changes in flagellar movement of rat spermatozoa along the length of the epididymis: manual and computer-aided image analysis. **Cell Motil. Cytoskeleton**, v.35, p.147-161, 1996.

JOHNSTON, S.D.; OSBORNE, C.A.; LIPOWITZ, A.J. Characterization of seminal plasma, prostatic fluid, and bulbourethral gland secretions in the domestic cat. In. INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL

REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 11th, 1988, Dublin. **Proceedings...** Dublin: 1988. p.560.

JOHNSTON, S.D.; ROOT, M.V.; OLSON, P.N.S. Ovarian and testicular function in the domestic cat: clinical management of spontaneous reproductive disease. **Animal Reprod. Sci.**, v.42, p.261-274, 1996.

JOHNSTON, S.D.; ROOT, M.V.; OLSON, P.N.S. **Canine and feline Theriognology**. Philadelphia: Saunders, 2001. 592p.

JOHNSTONE, I.P.; BANCROFT, B.J.; MCFARLANE, J.R. Testosterone and androstenedione profiles in the blood of domestic tom-cats. **Anim. Reprod. Sci.**, v.7, p.363-375, 1984.

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

KIRKPATRICK, J.F. Seasonal testosterone levels, testosterone clearance, and testicular weights in male domestic cats. **Can. J. Zool.**, v.63, p.1285-1287, 1985.

KRUGER, T.F.; ACOSTA, A.A.; SIMMONN, K.F.; SWANSON, R.J.; MATA, J.F.; OENINGER, S. Predictive value of abnormal sperm morphology in *in vitro* fertilization. **Fertil. Steril.**, v.49, p.112-117, 1988.

LARSEN, L.; SCHEIKE, T.; JENSEN, T.K.; BONDE, J.P.; ERNST, E.; HJOLLUND, N.H.; ZHOU, Y.; SKAKKEBAEK, N.E.; GIWERCMAN, A. Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. **Human Reprod.**, v.15, p.1562-1567, 2000.

LAWLER, D.F.; JOHNSTON, S.D.; HEGSTAD, R.L.; KELTNER, D.G.; OWENS, S.F. Ovulation without cervical stimulation in domestic cats. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.47, p.57-61, 1993.

LEIBO, S.P.; SONGSASEN, N. Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species. **Theriogenology**, v.49, p.1537-1543, 2002.

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

LEVYA, H.; STABENFELDT, G.H. Manipulation of the estrous cycle of the cat with photoperiod and melatonin. **Biol. Reprod. Suppl.**, v28, p.122-127, 1983.

LEVYA, H.; MADLEY, T.; STABENFELDT, G.H. Effect of light manipulation on ovarian activity and melatonin and prolactin secretion in the domestic cat. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.39, p.125-133, 1989a.

LEVYA, H.; MADLEY, T.; STABENFELDT, G.H. Effect of melatonin on photoperiod responses, ovarian secretions of oestrogen and coital responses in the domestic cat. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.39, p.135-142, 1989b.

LIU, D.Y.; CLARKE, G.N.; BAKER, H.W. Relationship between sperm motility assessed with the Hamilton-Thorn motility analyzer and fertilization rates *in vitro*. **J. Androl.**, v.12, p.231-239, 1991.

LUVONI, G.C.; RUGGIERO, C.; MARINONI, G.; KALCHSCHMIDT, E. Effect of taurine containing diluent for cryopreservation of domestic cat epididymal spermatozoa. **Theriogenology**, v.57, p.466, 2002.

MAXWELL, W.M.C.; WELCH, G.R.; JOHNSON, L.A. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. **Reprod. Fertil. Develop.**, v.8, p.1165-1178, 1997.

MCLAUGHLING, K.C.; HAMNER, C.E. A demonstration of cat seminal plasma antifertility activity. **P. Soc. Exp. Biol. Med.**, v.145, p.103-106, 1974.

MEDEIROS, C.M.O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A.T.D.; RODRIGUES, J.L. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, v.57, p.327-344, 2002.

MEIZEL, S. The mammalian sperm acrosome reaction, a biochemical approach. In: JOHNSON, M.H. (Ed.). **Development in mammals**. Amsterdam: Elsevier North-Holland, 1978. v.3, p.1-64.

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

MIGAKI, G. Compendium of inherited metabolic diseases in animals. **Prog. Clin. Biol. Res.**, v.94, p.473-501, 1982.

MILLIGAN, M.P.; HARRIS, S.; DENNIS, K.J. Comparison of sperm velocity in fertile and infertile groups as measured by time-lapse photography. **Fertil. Steril.**, v.34, p.509-551, 1980.

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.590, 1999.

OVERSTREET, J.W.; TOM, R.A. Experimental studies of rapid sperm transport in rabbits. **J. Reprod. Fertil.**, v.66, p.601-606, 1982.

PAAPE, S.R.; SHILLE, V.M.; SETO, H.; STABENFELDT, G.H. Luteal activity in the pseudopregnancy cat. **Biol. Reprod.**, v.13, p.470-474, 1975.

PALMER, E.; DRIANCOURT, M.A.; ORTAVANT, R. Photoperiodic stimulation of the mare during winter anoestrus. **J. Reprod. Fertil.**, v.32, p.275, 1982.

PARKS, E.J.; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v.38, p.209-222, 1992.

PARKS, J.E. Hypothermia and mammalian gametes. In: KAROW, M.A.; CRITSER, J.K. **Reproductive tissue banking**. San Diego: Academic Press, 1997. p.229-261.

PELICAN, K.M.; BROWN, J.L.; WILDT, D.E.; OTTINGER, M.A.; HOWARD, J.G. Short term suppression of the estrous cycle of the domestic cat using levonorgestrel versus a GnRH antagonist as assessed by fecal steroids. **Biol. Reprod. Suppl.**, v.62, p.115, 2000.

PELICAN, K.M.; SPINDLER, R.E.; WILDT, D.E.; OTTINGER, M.A.; HOWARD, J.G. Short term ovarian suppression with levonorgestrel before gonadotropin stimulation enhances IVF embryo production in the domestic cat. **Biol. Reprod. Suppl.**, v.64, p.52, 2001.

PELICAN, K.M.; BROWN, J.L.; WILDT, D.E.; OTTINGER, M.A.; HOWARD, J.G. Ovarian suppression with the progestin levonorgestrel improves ovulation induction for artificial insemination in the domestic cat. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.16, p.131, 2004.

PEÑA, A.I.; LUGILDE, L.L.; BARRIO, M.; HERRADÓN, P.G.; QUINTELA, L.A. Effects of Equex from different sources on post-thaw survival, longevity and intracellular Ca^{2+} concentration of dog spermatozoa. **Theriogenology**, v.59, p.1725-1739, 2003.

PLATZ Jr., C.C.; FOLLIS, T.; DEMOREST, N.; SEAGER, S. Semen collection, freezing and insemination in the domestic cat. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL

INSEMINATION, 8th, 1976, Kracow. **Proceedings...** Kracow: 1976. p.1053-1055.

PLATZ, C.C.; SEAGER, S.W.J. Semen collection by electroejaculation in the domestic cat. **J. Anim. Vet. Med. Assoc.**, v.178, p.1353-1355, 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.279-282, 1978.

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

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

POPE, C.E.; TURNER, J.L.; QUATMAN, S.P.; DRESSER, B.L. Semen storage in the domestic felid a comparison of cryopreservation methods and storage temperatures. **Biol. Reprod.**, v.144, p.117, 1991b.

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

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

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

POPE, C.E.; GOMEZ, M.C.; DRESSER, B.L. *In vitro* embryo production and embryo transfer in domestic and non-domestic cats. **Theriogenology**, v.66, p.1518-1524, 2006.

PUKAZHENTHI, B.; PELICAN, K.; WILDT, D.E.; HOWARD, J.G. Sensivity of domestic cat (*Felis catus*) sperm from normospermic versus teratospermic donors to cold-induced acrosomal damage. **Biol. Reprod.**, v.61, p.135-141, 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.139-150, 2000.

PUKAZHENTHI, B.S.; WILDT, D.E.; HOWARD, J.G. The phenomenon and significance of teratospermia in felids. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.57, p.423-433, 2001.

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

PUKAZHENTHI, B.; WILDT, D.E. Which reproduction technologies are most relevant to studying, managing and conserving wildlife? **Reprod. Fertil. Dev.**, v.16, p.33-46, 2004.

REERS, M.; SMITH, T.W.; CHEN, L.B. J-aggregate formation of a corbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. **Biochemistry-US**, v.30, p.4480-4486, 1991.

ROBINSON, B.L.; SAWYER, C.H. Hypothalamic control of ovulation and behavioral estrus in the cat. **Brain Res.**, v.418, p.41-51, 1987.

ROOT, M.V.; JOHNSTON, S.D.; OLSON, P.N.S. Estrous length, pregnancy rate, gestation and parturition lengths, litter size, and juvenile mortality in the domestic cat. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, v.31, p.429-433, 1995.

ROTH, T.L.; WOLFE, B.A.; LONG, J.A.; HOWARD, J.G.; WILDT, D.E. Effects of equine chorionic gonadotropin, human chorionic gonadotropin, and laparoscopic artificial insemination on embryo, endocrine, and luteal characteristics in the domestic cat. **Biol. Reprod.**, v.57, p.165-171, 1997.

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

SCHMIDT, P.M.; CHAKRABORTY, P.K.; WILDT, D.E. Ovarian activity, circulating hormones and sexual behavior in the cat II. Relationships during pregnancy, parturition, lactation and the postpartum estrus. **Biol. Reprod.**, v.28, p.657-671, 1983.

SCOTT, M.G.; SCOTT, P.P. Post-natal development of the testis and epididymis in the cat. **J. Physiol.**, v.136, p.40-41, 1957.

SHILLE, V.M.; LUNDSTROM, K.E.; STABENFELDT, G.M. Follicular function in the domestic cat as determined by estradiol 17 β concentrations in plasma: relation to estrous behavior and cornification of exfoliated vaginal epithelium. **Biol. Reprod.**, v.21, p.953-963, 1979.

SHILLE, V.M.; MUNRO, C.; FAMER, S.W.; PAPKOFF, H.; STABENFELDT, G.H. Ovarian and endocrine responses in the cat after coitus. **J. Reprod. Fertil.**, v.69, p.29-39, 1983.

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

STABENFELDT, G.H.; SHILLE, V.M. Reproduction in dog and cat. In:_____ **Reproduction in domestic animals**. 3.ed. New York: Eds H.H. Cole & P.T. Cupps. Academic Press, 1977. p.499-427.

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

STACHECKI, J.J.; GINSBURG, K.A.; ARMANT, D.R. Stimulation of cryopreserved epididymal spermatozoa of domestic cat using the motility stimulants caffeine, pentoxifylline, and 2'-deoxyadenosine. **J. Androl.**, v.15, p.157-164, 1994.

STACHECKI, J.J.; DRESSER, B.L.; POPE, C.E.; ARMANT, D.R. Stimulation of ejaculated domestic cat sperm motility with caffeine, pentoxifylline, and 2'-deoxyadenosine. **Arch. Androl.**, v.34, p.63-68, 1995.

SUKCHAROEN, N.; KEITH, J.; IRVINE, D.S.; AITKEN, R.J. Predicting the fertilizing potential of human sperm suspensions *in vitro*: importance of sperm morphology and leukocyte contamination. **Fertil. Steril.**, v.63, p.1293-1300, 1995.

SUKCHAROEN, N.; SITHIPRAVEJ, T.; PROMVIENGCHAI, S.; CHINPILAS, V.; BOONKASEMSANTI, W. Sperm morphology evaluated by computer (IVOS) cannot predict the fertilization rate *in vitro* after intracytoplasmic sperm injection. **Fertil. Steril.**, v.69, p.564-568, 1998.

SWANSON, W.F.; GODKE, R.A. Transcervical embryo transfer in the domestic cat. **Lab. Anim. Sci.**, v.44, p.288-291, 1994.

SWANSON, W.F.; ROTH, T.L.; WILDT, D.E. *In vivo* embryogenesis, embryo migration, and embryonic mortality in the domestic cat. **Biol. Reprod.**, v.51, p.452-464, 1994.

SWANSON, W.F.; HOROHOV, D.W.; GODKE, R.A. Production of exogenous gonadotrophin-neutralizing immunoglobulins in cats after repeated eCG-hCG treatment and relevance for assisted reproduction in felids. **J. Reprod. Fertil.**, v.105, p.35-41, 1995.

SWANSON, W.F.; GRAHAM, K.; HOROHOV, D.W.; THOMPSON, D.L.; GODKE, R.A. Ancillary follicle and secondary corpora lutea formation following exogenous gonadotropin treatment in the domestic cat and effect of passive transfer of gonadotropin-neutralizing antisera. **Theriogenology**, v.45, p.561-572, 1996a.

SWANSON, W.F.; ROTH, T.L.; GRAHAM, K.; HOROHOV, D.W.; GODKE, R.A. Kinetics of humoral immune response to multiple treatments with exogenous gonadotropins and relation to ovarian responsiveness in domestic cats. **Am. J. Vet. Res.**, v.57, p.302-307, 1996b.

SWANSON, W.F.; WOLFE, B.A.; BROWN, J.L.; MARTIN-JIMENEZ, T.; RIVIERE, J.E.; ROTH, T.L.; WILDT, D.E. Pharmacokinetics and ovarian-stimulatory effects of equine and human chorionic gonadotropins administered singly and in combination in the domestic cat. **Biol. Reprod.**, v.57, p.295-302, 1997.

SWANSON, W.F.; BROWN, J.L. International training programs in reproductive sciences for conservation of Latin American felids. **Anim. Reprod. Sci.**, v.82-83, p.21-34, 2004.

TAKAYA, A. A study on superovulation and embryo development in the domestic cat. **Jpn. J. Vet. Res.**, v.37, p.132, 1989.

TANAKA, A.; KUWABARA, S.; TAKAGI, Y.; NAKAGAWA, K.; FUJIMOTO, Y.; MURAI, M.; TSUTSUI, T. Effect of intervals on semen quality in cats. **J. Vet. Med. Sci.**, v.62, p.1157-1161, 2000a.

TANAKA, A.; TAKAGI, Y.; NAKAGAWA, K.; FUJIMOTO, Y.; HORI, T.; TSUTSUI, T. Artificial intravaginal insemination using fresh semen in cats. **J. Vet. Med. Sci.**, v.62, p.1163-1167, 2000b.

TEBET, J.M.; MARTINS, M.I.M.; CHIRINEA, V.H.; SOUZA, F.F.; CAMPAGNOL, D.; LOPES, M.D. Cryopreservation effects on domestic cat epididymal versus electroejaculated spermatozoa. **Theriogenology**, v.66, p.1629-1632, 2006.

THOMAS, C.A.; GARNER, D.L.; DEJARNETTE, J.M.; MARSHALL, C.E. Effect of cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determinate by flow cytometry. **Biol. Reprod.**, v.58, p.786-793, 1998.

TITTARELI, C.; SAVIGNONE, C.; ARNAUDIN, E.; STORNELLI, M.C.; STORNELLI, M.A.; DE LA SOTA, R.L. Effect of transport media and storage time on survival of spermatozoa recovered from canine and feline epididymides. **Theriogenology**, v.66, p.1637-1640, 2006.

TSUTSUI, T.; SATO, M.; KUROAWA, N.; HATTORI, I.; MATSUNAGA, H.; MURAO, I.; STABENFELDT, G.H. Embryo transfer in the cat during non-breeding season. **Jpn. J. Vet. Sci.**, v.51, p.871-877, 1989.

TSUTSUI, T.; MURAO, I.; KAWAKAMI, E.; OGASA, A.; STABENFELDT, G.H. Androgen concentration in the blood and spermatogenic function of tom cats during the breeding season. **Jpn. J. Vet. Sci.**, v.52, p.801-806, 1990.

TSUTSUI, T.; TANAKA, A.; TAKAGI, Y.; NAKAGAWA, K.; FUJIMOTO, Y.; MURAI, M.; ANZAI, M.; HORI, T. Unilateral intrauterine horn insemination of fresh semen in cats. **J. Vet. Med. Sci.**, v.62, p.1241-1245, 2000a.

TSUTSUI, T.; TANAKA, A.; TAKAGI, Y.; NAKAGAWA, K.; FUJIMOTO, Y.; MURAI, M.; ANZAI, M.; HORI, T. Unilateral intrauterine horn insemination of frozen semen in cats. **J. Vet. Med. Sci.**, v.62, p.1247-1251, 2000b.

TSUTSUI, T.; TANAKA, A.; HORI, T. Intratubal insemination with fresh semen in cats. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.57, p.347-351, 2001.

TSUTSUI, T.; WADA, M.; ANZAI, M.; HORI, T. Artificial insemination with frozen epididymal sperm in cats. **J. Vet. Med. Sci.**, v.65, 397-399, 2003.

VERHAGE, H.G.; BEAMER, N.B.; BRENNER, R.M. Plasma levels of estradiol and progesterone in the cat during polyestrus, pregnancy and pseudopregnancy. **Biol. Reprod.**, v.14, p.579-585, 1976.

VERSTEGEN, J.P.; ONCLIN, K.; SILVA, L.D.M.; DONNAY, I.; METTENS, P.; METTENS, P.; ECTORS, P. Superovulation and embryo culture *in vitro* following treatment with ultra-pure follicle-stimulating hormone in cats. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v. 47, p.209-218, 1993.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v.57, p.149-179, 2002.

VIEIRA, S. **Bioestatística**: tópicos avançados. 2.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. 216p.

VILLAYERDE, A.I.S.B.; MARTINS, M.I.M.; CASTRO, V.B.; TRINCA, L.; LOPES, M.D. Morphological and functional characteristics of chilled semen obtained from domestic feline epididymides (*Felis catus*). **Theriogenology**, v.66, p.1641-1644, 2006.

WATSON, P.F.; GLOVER, T.E. Vaginal anatomy of the domestic cat (*Felis catus*) in relation to copulation and artificial insemination. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.47, p.355-359, 1993.

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.7, p.871-891, 1995.

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

WILDT, D.E.; KINNEY, G.M.; SEAGER, S.W.J. Gonadotropin induced reproductive cyclicity in the domestic cat. **Lab. Anim. Sci.**, v.28, p.301-307, 1978.

WILDT, D.E.; SEAGER, S.W.J.; CHAKRABORTY, P.K. Effect of copulatory stimuli on incidence of ovulation and on serum luteinizing hormone in the cat. **Endocrinology**, v.107, p.1212-1217, 1980.

WILDT, D.E.; CHAN, S.Y.W.; SEAGER, S.W.J.; CHAKRABORTY, P.K. Ovarian activity, circulating hormones, and sexual behavior in the cat. I. Relationships during the coitus-induced luteal phase and the estrous period without mating. **Biol. Reprod.**, v.25, p.15-28, 1981.

WILDT, D.E.; BUSH, M.; HOWARD, J.G.; O'BRIEN, S.J.; MELTZER, D.; VANDYK, A.; EBEDES, H.; BRAND, D.J. Unique seminal quality in the South African cheetah and a comparative evaluation in the domestic cat. **Biol. Reprod.**, v.29, p.1019-1025, 1983.

WILDT, D.E.; PHILLIPS, L.G.; SIMMONS, L.G.; GOODROWE, K.L.; 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. (ed.) **Tigers of the world: the biology, biopolitics, management, and conservation of an endangered species**. New Jersey: Noyes Publication, 1987. p. 255-279.

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

WILDT, D.E. Endangered species spermatozoa: diversity, reseach and conservation. In: BARTKE, A. **Function of somatic cells in the testes**. New York: Springer-Verlag, 1994, p.1-24.

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

WOOD, T.C.; SWANSON, W.F.; DAVIS, R.M.; ANDERSON, J.E.; WILDT, D.E. Functionality of sperm from normo- versus teratospermic domestic cats cryopreserved in pellets or straw containers. **Theriogenology**, v.39, p.342, 1993.

ZAMBELLI, D.; CASTAGNETTI, C. Transcervical insemination with fresh or frozen semen in the domestic cat: new technique and preliminary results. In: ANNUAL CONFERENCE OF THE EUROPEAN SOCIETY FOR DOMESTIC ANIMAL REPRODUCTION (ESDAR), 5th, 2001, Vienna. **Proceeding...** Vienna: 2001. p.34.

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

ZAMBELLI, D.; BUCCIOLI, M.; CASTAGNETTI, C.; BELLUZZI, S. Vaginal cervical anatomic modification during the oestrus cycle in relation to transcervical catheterization in the domestic cat. **Reprod. Dom. Anim.**, v.39, p.76-80, 2004.

ZAMBELLI, D.; CUNTO, M. Transcervical artificial insemination in the cat. **Theriogenology**, v.64, p.698-705, 2005.

Anexos

ANEXO 1**QUADRO 4.** Valores do setup estabelecido para a avaliação do sêmen do gato doméstico no sistema HTR–IVOS-10, Botucatu, 2007.

Variável		Valor
Frames por segundo		60 Hz
Número de frames		50
Contraste mínimo		30
Mínimo tamanho celular		3 pixel
Default	Tamanho celular	5 pixel
	Intensidade celular	100
Células progressivas	VAP	70 $\mu\text{m/s}$
	STR	80%
Células lentas	VAP – Cutoff	30 $\mu\text{m/s}$
	VSL m – Cutoff	20 $\mu\text{m/s}$

ANEXO 2

QUADRO 5. Apresentação das diferentes alterações na morfologia espermática avaliadas dentro de cada categoria (defeitos maiores ou menores) na coluna à esquerda e classificação utilizada para a realização da análise dos resultados na coluna à direita.

Defeitos maiores	
Acrossomo	Defeitos de acrossomo
Subdesenvolvida	Defeitos de cabeça
Isolada patológica	
Estreita na base	
Piriforme	
Pequena anormal	
Contorno anormal	
Gota citoplasmática proximal	Gota citoplasmática proximal
Formas teratológicas	Formas teratológicas
Peça intermediária (fraturada, defrilação ruturada, dobrada, edema, aplasia)	Defeitos de peça intermediária
Fortemente dobrada ou enrolada	Defeitos de cauda
Dobrada com gota	
Enrolada na cabeça	
Formas duplas	Formas duplas
Defeitos menores	
Delgada	Defeitos de cauda
Gigante, curta, larga, peq. normal	
Isolada normal	
Retro e abaxial, oblíquo	Defeitos de inserção
Dobrada ou enrolada	Defeitos de cauda
Gota citoplasmática distal	Gota citoplasmática distal

ANEXO 3

Preparo das soluções de estoque e de trabalho das sondas fluorescentes IP, PSA e JC-1.

FITC-PSA (L-0770, SIGMA)

DILUIÇÃO 1 - SOLUÇÃO DE AZIDA DE Na	
AZIDA DE Na	200 mg
PBS	20 mL

DILUIÇÃO 2 - SOLUÇÃO TRABALHO (100 µg/ mL)	
SOLUÇÃO DE AZIDA Na	20 mL
FITC-PSA	2 mg

Estocar na geladeira

Iodeto de Propídio (P-4170, SIGMA)

SOLUÇÃO TRABALHO (500 µg/ mL)	
IODETO DE PROPÍDIO	5 mg
PBS	10 mL

Estocar no freezer

JC-1 (T3168, Molecular Probes)

DILUIÇÃO 1 - SOLUÇÃO ESTOQUE (7650 µM)	
JC-1	5 mg
DMSO	1 mL

DILUIÇÃO 2 - SOLUÇÃO TRABALHO (76,5 µM)	
SOLUÇÃO ESTOQUE	50 µL
DMSO	4950 µL

Estocar no freezer

ANEXO 4

Tabela 8. Valores de progesterona sérica (ng/ mL) obtidos de gatas domésticas durante (Momento 1) ou após 18 a 21 do procedimento de inseminação artificial (Momento 2), Botucatu, 2007.

Gata	Momento	Dosagem de progesterona (ng/ mL)
3	1	0,0569
	2	21,2735
4	1	0,1021
8	1	0,2738
	2	> 40
9	1	0,1706
	2	13,8845
11	1	0,4212
	2	37,9470
12	1	0,2748
	2	13,8365
13	1	0,9452
	2	16,4345
14	1	0,1488
	2	22,1470
15	1	0,2476
	2	18,9495
16*	1	0,2287
16**	1	1,2885
	2	11,3700
19	1	0,3100
	2	23,0100
24	1	1,7061
	2	> 40
25	1	0,1631
	2	18,2145
26	1	0,3512
	2	13,9140
27	1	0,6426
	2	8,0073
28	1	0,0693
	2	> 40
29	1	0,1221
	2	13,8515
30	1	0,1169
	2	27,6175

* Quando a gata 16 foi utilizada para a IAIU

** Quando a gata 16 foi utilizada para a IAIV