

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RENATO HERDINA ERDMANN

PROTÓCOLOS DE CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN EM FELÍDEOS DO
GÊNERO *Leopardus* E QUANTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS FECAIS DE
ANDRÓGENOS E GLICOCORTICÓIDES.

CURITIBA
2014

RENATO HERDINA ERDMANN

PROTOCOLOS DE CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN EM FELÍDEOS DO
GÊNERO *Leopardus* E QUANTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS FECALIS DE
ANDRÓGENOS E GLICOCORTICOIDES.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas – Zoologia, Setor de Ciências
Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como
requisito parcial à obtenção do título de Doutor em
Ciências, área de concentração Zoologia.
Orientador: Nei Moreira

CURITIBA
2014



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação Zoologia



TERMO DE APROVAÇÃO

Renato Herdina Erdmann

“Protocolos de Criopreservação de Sêmen e Quantificação de Metabólitos Fecais de Andrógenos e Glicocorticoides em Felídeos do Gênero *Leopardus*.”

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Zoologia, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte Comissão Examinadora:

Nei Moreira
Orientador

Dr. Paulo Rogerio Magnini
Membro Externo

Dr. Claudio Alvarenga de Oliveira
Membro Externo

Dr. João Marcelo D. de Miranda
Membro Interno

Dr. Rogério Ribas Lange
Membro Interno

Curitiba, 28 de Fevereiro de 2014.

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Zoologia/UFPR
Setor de Ciências Biológicas - Departamento de Zoologia
Caixa Postal 19020 - CEP 81531-980 - Curitiba - Paraná
Telefone/FAX +55 (0**41) 3361-1641

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus pelo dom da Vida.

À Marilis, William e Jamile, que, pelo apoio, tranquilidade e amor do lar, foi permitida esta jornada.

Ao Prof. Nei Moreira, pela orientação, ensinamentos, dedicação e amizade, com que foi conduzido este trabalho.

Aos meus pais, Arthur (*in memoriam*) e Zailde, que pelo amor sempre dedicado, desde cedo incentivaram esta atividade.

Aos estagiários Rodrigo e Marcel, hoje distintos profissionais, que mais ensinaram que aprenderam.

Ao Prof. Marcisnei pelo companheirismo, amizade e apoio.

Ao Wanderlei, Zalmir, Marcos e Rosana, profissionais comprometidos, que deram apoio e suporte técnico a esta pesquisa.

A todos os colegas da PUCPR, Clínica veterinária Santa Clara e FAG, que, direta ou indiretamente participaram deste período.

Ao Laboratório Biovel, que disponibilizaram exames laboratoriais.

À UFPel, na pessoa do Dr. Rafael G. Mondadori e das colegas Jorgea e Carine, pela disponibilização de insumos, equipamentos e auxílio na realização de exames necessários à tese.

Ao Programa de Pós-Graduação em Zoologia – UFPR, pela oportunidade de realizar o Doutorado.

Ao CNPq e Fundação Araucária, pelo apoio financeiro.

À ITAIPU binacional, que disponibilizou o objeto de pesquisa e as condições necessárias para sua realização.

RESUMO

Foram testados a eficiência de novas biotecnologias da reprodução em jaguatiricas (*Leopardus pardalis* Linnaeus, 1758), gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus* Schreber, 1775) e gato-maracajá (*Leopardus wiedii* Schinz, 1821). Quatro indivíduos de *L. pardalis* foram anestesiados em quatro a cinco ocasiões, com um intervalo de 30 dias, em um total de 17 procedimentos, com uma associação intramuscular (IM) de cloridrato de tiletamina-zolazepam (7 mg/kg) e xilazina (1 mg/kg). A combinação de tiletamina-zolazepam e xilazina proporcionou uma boa qualidade da anestesia, período de latência curto, bom período anestésico viável e segurança na eletroejaculação de *L. pardalis*, com boa qualidade de sêmen obtido. *L. tigrinus* (n=13) e *L. wiedii* (n=6) também foram submetidos a colheitas mensais de sêmen, com três a cinco repetições cada indivíduo. As amostras foram avaliadas e protocolos de *criopreservação* foram testados com diluentes comerciais (Bioxcell®, em *L. tigrinus*; Andromed® em *L. tigrinus*, *L. wiedii* e *L. pardalis*; Test Yolk Buffer® em *L. tigrinus*, *L. wiedii* e *L. pardalis*) foram testadas também duas curvas de criopreservação: a) curva TK congelamento em equipamento automatizado (TK® 3000) com taxas de refrigeração de - 0,25°C/min e de congelação de - 20°C/min e b) curva GEL com refrigeração e estabilização em geladeira 20°C à 5°C em duas horas e congelação numa caixa de isopor em 4 minutos em plataformas com 8 cm e 3 cm acima do nitrogênio, apresentando melhores resultados com diluente TYB associado à curva TK em todos os experimentos. A capacidade de detectar andrógenos fecais foi testada por dois *kits* comerciais: Testosterona (EIA-1559 DRG) e Testosterona (CLIA - 33560Beckman Coulter) em *L. wiedii* estimulados com análogo de GnRH (n=3) e análogo de hCG (n=2), a detecção de andrógenos fecais com o *kit* comercial Testosterona (EIA -1559 - DRG) em machos de *L. pardalis* (n = 2) e *L. tigrinus* (n=1) também estimulados com análogos de GnRH e a detecção de corticoides fecais pelo *kit* comercial Cortisol (EIA-1887 - DRG), em machos *L. wiedii* (n=2), *L. pardalis* (n=2) e *L. tigrinus* (n=2) estimulados com análogo de ACTH. Foi observado uma forte correlação ($r=0,9299$ e $p<0,0001$) entre os métodos EIA e CLIA. Os *kits* Testosterona EIA DRG-1559 e DRG Cortisol EIA-1887, respectivamente, foram eficazes na identificação de alterações dos metabólitos fecais de andrógenos e corticoides em *L. wiedii*, *L. pardalis* e *L. tigrinus* estimulados com GnRH e ACTH. Machos de *L. wiedii* (n=6) foram avaliados para eficiência reprodutiva em cativeiro pelo monitoramento de andrógenos fecais, exame clínico, coleta de sêmen por eletroejaculação (n=30) e pareamento com fêmeas (n=5). Todos os machos produziram sêmen, mas um animal foi azoospérmico em todas as amostras e outro animal foi azoospérmico na maioria das amostras (4/5). O sêmen de *L. wiedii* mostrou uma baixa taxa de espermatozoides móveis ($8,44 \pm 1,95 \times 10^6$ sptz/ml) com altas taxas de defeitos espermáticos ($46,29 \pm 3,79$ %). Foi gerado apenas um filhote. O período de pareamento com fêmeas não influenciou o nível de andrógenos fecais ($p=0,995$) ou a produção média de espermatozoides viáveis ($p=0,469$), antes e após o período.

Palavras chaves: Androgenos, corticoides, felídeos, endocrinologia.

ABSTRACT

Testing the efficiency of alternative technologies in reproduction programs were the objectives of this work in Ocelots (*Leopardus pardalis*), tigrinas (*Leopardus tigrinus*) and margays (*Leopardus wiedii*). Frozen semen has been used in genomic resource banking of endangered species.. Four *L. pardalis* were anesthetized on four to five different occasions with an interval of 30 days, totaling 17 procedures, with tiletamine-zolazepam hydrochloride (7 mg/kg) and xylazine (1 mg/kg) association. This combination of tiletamine-zolazepam and xylazine provided a good anesthesia quality of a short latency period, good viable anesthetic period and safety to proceed the electroejaculation in *L. pardalis*, with good quality of obtained semen. *L. tigrinus* (n=13), *L. pardalis* (n=4) and *L. wiedii* (n=6) were anesthetized and subjected to monthly collections of semen with three to five replications in each individual. Samples were evaluated and semen were tested for cryopreservation protocols with commercial diluents (Bioxcell®, in *L. tigrinus*; Andromed® in *L. tigrinus*, *L. wiedii* and *L. pardalis*; Test Yolk Buffer® in *L. tigrinus*, *L. wiedii* and *L. pardalis*) and two cryopreservation curves a) TK freezing curve in automated equipment (TK 3000®) with cooling rates - 0.25°C/min and freezing -20°C/min and b) GEL curve with cooling and stabilization in refrigerator 20°C to 5°C in two hours and freezing in a styrofoam box in 4 minutes in 8 cm and 3 cm above the nitrogen platforms, showing better results with TYB diluent associated TK curve in all experiments. In this work the ability to detect fecal androgens was tested by two different commercial kits: Testosterone (EIA-1559 DRG) method by enzymeimmunoassay (EIA) and 33560 Testosterone assay (Beckman Coulter) by chemiluminescence (CLIA) in *L. wiedii* stimulated with GnRH analog (n=3) and hCG analog (n=2), the detection of fecal androgens Testosterone commercial kit (EIA-1559 - DRG) in male *L. pardalis* (n=2) and *L. tigrinus* (n=1) stimulated with GnRH analogues and detection of fecal steroids by Cortisol commercial kit (EIA-1887 - DRG) by the method of enzymeimmunoassay (EIA) in male *L. wiedii* (n=2), *L. pardalis* (n=2) and *L. tigrinus* (n = 2) stimulated with ACTH analog. DRG (EIA) and Beckman Coulter (CLIA) with a strong correlation ($r=0.9299$ and $p<0.0001$) between methodologies. Testosterone EIA kits DRG-1559 and DRG Cortisol EIA-1887, respectively, were effective in identifying endocrine changes of fecal androgens and fecal steroids in *L. wiedii*, *L. pardalis* and *L. tigrinus* stimulated with GnRH and ACTH. Males of *L. wiedii* (n=6) were evaluated for reproductive efficiency in captivity, through fecal androgens monitoring, clinical examination, semen collection by electroejaculation (n=30), pairing with females (n=5). All males produced semen, but one animal was azoospermic in all collection procedures and other animal was azoospermic in most samples (4/5). The semen showed a low rate of mobile sperm ($8.44 \pm 1.95 \times 10^6$ sptz/ml) with high morphological sperm defects ($46.29 \pm 3.79\%$). Five males and five females were paired for 70 days, generating only one puppy. The pairing with females did not influence the level of fecal androgens ($p=0.995$) or the average production of viable sperm ($p=0.469$) measured before and after the period.

Key-words: androgens, fecal steroids, felids, endocrinology.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

INTRODUÇÃO

Figura 1 – Linhagens e espécies de felídeos, com suas relações filogenéticas, conforme O'Brien e Johnson (2007).16

ARTIGO 1

Tabela 1. Reações de sensibilidade dolorosa observadas em 17 procedimentos realizados em quatro exemplares de jaguatirica (*Leopardus pardalis*) durante o tempo de anestesia, utilizando-se a associação tiletamina-zolazepam ($6,28 \pm 0,8$ mg/kg) e xilazina ($0,98 \pm 0,15$ mg/kg) para coleta de sêmen por eletroejaculação.31

Tabela 2: Miorrelaxamento observado em 17 procedimentos realizados em quatro exemplares de jaguatirica (*Leopardus pardalis*) durante o tempo de anestesia, utilizando-se a associação tiletamina-zolazepam ($6,28 \pm 0,8$ mg/kg) e xilazina ($0,98 \pm 0,15$ mg/kg) para coleta de sêmen por eletroejaculação.....31

Tabela 3. Valores de frequência cardíaca (FC), respiratória (FR) e temperatura retal (T°C), observados em 17 procedimentos realizados em quatro exemplares de jaguatirica (*Leopardus pardalis*) durante o tempo de anestesia, utilizando-se a associação tiletamina-zolazepam ($6,28 \pm 0,8$ mg/kg) e xilazina ($0,98 \pm 0,15$ mg/kg) para coleta de sêmen por eletroejaculação.....32

ARTIGO 2

Tabela1 - Componentes dos diluentes comerciais utilizados no experimento.48

Tabela 2 - Parâmetros andrológicos de *L. pardalis* (n=4)51

Tabela 3 – Motilidade progressiva, índice de motilidade espermática e percentual de acrossoma intacto nas amostras de sêmen em diferentes protocolos testados e nos diferentes tempos de análise.....52

Figura 1 - Queda de índice de motilidade espermática (IME \pm erro padrão da média) nos diferentes protocolos testados (TYB-TK, AND-TK, TYB-GEL).....54

Tabela 4 – Parâmetros seminais de *L. pardalis* encontrados em trabalhos realizados no Brasil.....55

ARTIGO 3

Tabela 1 – Resultado de curvas e diluentes testados em criopreservação seminal de <i>Leopardus tigrinus</i> (n=13 animais; n=47 amostras).....	75
Tabela 2 – Comparação entre machos de <i>Leopardus tigrinus</i> que tiveram ao menos três partidas de sêmen criopreservado.....	76
Tabela 3 – Parâmetros seminais de <i>Leopardus tigrinus</i> reportado por diferentes autores.....	78

ARTIGO 4

Quadro 1 - Animais e estímulo hormonal aplicado	94
Figura 1 – Macho de <i>L. wiedii</i> estimulado com análogo de GnRH com detecção de andrógenos fecais pelos métodos de enzimoimunoensaio (EIA) e quimioluminescência (CLIA) (r=0,914 e p=0,0002).	99
Figura 2 – <i>Leopardus wiedii</i> 1495a estimulado com análogo de GnRH com detecção de andrógenos fecais pelos métodos EIA e CLIA (r=0,930 e p=0,002).....	99
Figura 3 – <i>Leopardus wiedii</i> 2409 estimulado com análogo de GnRH com detecção de andrógenos fecais pelos métodos EIA e CLIA (r=0.992 e p<0,0001).....	99
Figura 4 – <i>Leopardus pardalis</i> 2323 estimulado com análogo de GnRH com detecção de andrógenos fecais pelo método EIA.....	100
Figura 5 – <i>Leopardus pardalis</i> 2398 estimulado com análogo de GnRH com detecção de andrógenos fecais pelo método EIA.....	100
Figura 6 – <i>Leopardus tigrinus</i> 2208 estimulado com análogo de GnRH com detecção de andrógenos fecais pelo método EIA.....	100
Figura 7 – <i>Leopardus wiedii</i> 1801 estimulado com análogo de hCG com detecção de andrógenos fecais pelo método EIA.....	101
Figura 8 – <i>Leopardus wiedii</i> 2452 estimulado com análogo de hCG com detecção de andrógenos fecais pelo método EIA.....	101
Figura 9 – <i>Leopardus wiedii</i> 2333 estimulado com análogo de ACTH com detecção de corticoides fecais pelo método EIA.....	102
Figura 10 – <i>Leopardus wiedii</i> 2409 estimulado com análogo de ACTH com detecção de corticoides fecais pelo método EIA.....	102

Figura 11 – <i>Leopardus pardalis</i> 2324 estimulado com análogo de ACTH com detecção de corticoides fecais pelo método EIA.....	103
Figura 12 – <i>Leopardus pardalis</i> 1720 estimulado com análogo de ACTH com detecção de corticoides fecais pelo método EIA.....	103
Figura 13 – <i>Leopardus tigrinus</i> 1907 estimulado com análogo de ACTH com detecção de corticoides fecais pelo método EIA.....	103
Figura 14 - <i>Leopardus tigrinus</i> 2334 estimulado com análogo de ACTH com detecção de corticoides fecais pelo método EIA.....	104.

ARTIGO 5

Tabela 1 - Dados biológicos dos machos e fêmeas utilizados no trabalho, oriundos do Refúgio Biológico Bela Vista da Itaipu Binacional, Foz do Iguaçu - PR.....	128
Tabela 2 - Componentes dos diluentes comerciais utilizados no experimento.	132
Figura 1 – Espermatozoides analisados por sondas fluorescentes. (A) Avaliação de integridade de acrossoma; cabeça da célula corada de vermelho, o acrossoma foi considerado danificado. (B) Avaliação de integridade de membrana espermática; células espermáticas apresentando fluorescência verde foram consideradas íntegras, células espermáticas apresentando fluorescência vermelha foram consideradas danificadas.(C) Avaliação de atividade mitocondrial; células que apresentavam a peça intermediária com uma intensa fluorescência verde foram consideradas com mitocôndrias íntegras.....	136
Tabela 3 – Parâmetros andrológicos de coletas de sêmen (n=30) de <i>L. wiedii</i> (n=6) e níveis de andrógenos das amostras fecais (n=94).	138
Tabela 4 – Morfologia espermática das amostras de sêmen (n=30) de <i>L. wiedii</i> (n=6).....	138
Figura 2 - Média de andrógenos fecais nos períodos pré e pós-pareamento de <i>L. wiedii</i> machos (n=5) que foram pareados com fêmeas.....	139
Figura 3 – Média de espermatozoides viáveis de sêmen coletado em cinco <i>L. wiedii</i> , sem diferença estatística entre as coletas ($p > 0,05$).....	140
Tabela 5 – Dados reprodutivos individuais de <i>L. wiedii</i> e resultados de criopreservação.....	141

Figura 4 – Índice de motilidade espermática nas etapas de criopreservação seminal, com os diferentes protocolos testados.....	141
Figura 5 – Resultados de avaliações de integridade acrossômica, integridade de membrana e atividade mitocondrial no sêmen descongelado, nos diferentes protocolos testados.....	142

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	4
RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	6
LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	7
INTRODUÇÃO.....	13
ARTIGO 1 - Contenção farmacológica da jaguatirica, <i>Leopardus pardalis</i> (Linnaeus 1758), para coleta de sêmen, pela associação de tiletamina-zolazepam e xilazina	22
Resumo.....	23
Abstract.....	24
Introdução.....	24
Material e métodos.....	25
Resultados.....	27
Discussão.....	29
Conclusão.....	32
Referências.....	33
ARTIGO 2 - Avaliação de protocolos para criopreservação de sêmen de jaguatiricas (<i>Leopardus pardalis</i> Lineaus, 1758).....	38
Resumo.....	39
Abstract.....	40
Introdução.....	41
Material e métodos.....	42
Análises do sêmen descongelado.....	46
Resultados.....	47
Discussão.....	51
Conclusões.....	55
Referências.....	55
ARTIGO 3 - Avaliação de diluentes comerciais para criopreservação de sêmen de gato-do-mato-pequeno (<i>Leopardus tigrinus</i> Schreber, 1775).....	60
Resumo.....	61
Abstract.....	62
Introdução.....	63
Material e métodos.....	65
Resultados.....	70
Discussão.....	72

Conclusões	76
Referências	76
ARTIGO 4 - Validação de teste de detecção de andrógenos e corticoides fecais por enzimoimunoensaio e quimioluminescência em felídeos do gênero <i>Leopardus</i>	79
Resumo.....	80
Abstract.....	81
Introdução	82
Materiais e método.....	85
Resultados e discussão	90
Conclusões	105
Referências.....	105
ARTIGO 5 - Monitoramento reprodutivo e endócrino de machos de gato-maracajá (<i>Leopardus wiedii</i> Schinz, 1821) e testes de criopreservação de sêmen	110
Resumo.....	111
Abstract.....	112
Introdução	113
Material e métodos.....	115
Resultados	125
Discussão	130
Conclusões	136
Referências.....	137
CONCLUSÃO.....	142

INTRODUÇÃO

A ação antrópica provocou mudanças significativas nos padrões de distribuição de plantas e animais no planeta nos últimos 10.000 anos, com maior intensidade nos últimos 100 anos, principalmente pela fragmentação de habitats. Apesar dos esforços de ambientalistas para mitigação destes fatos a realidade é que varias espécies de animais e plantas estão criticamente ameaçados de extinção.

Há tempos a preocupação com a conservação de felídeos se mostra em destaque. Por estarem no topo da cadeia alimentar, são extremamente sensíveis a pequenas alterações provocadas pelo homem na natureza. Nowel e Jackson em 1996 já apontaram: “Todos os felídeos, com exceção do gato doméstico, estão no momento ameaçados em algum grau e várias espécies são vistas como criticamente em perigo”.

De modo geral, os especialistas concordam que há 37 espécies na família Felidae, havendo esquemas de classificação divergentes com base em dados diferentes. Em estudos de DNA, Johnson *et al.* (2006) identificaram 37 espécies, distribuídas em oito grupos distintos ou linhagens, definidos exclusivamente por análises moleculares. O'Brien e Johnson (2007) apresentaram uma proposta de cladograma baseado nestas análises conforme exposto na Figura 1. Essa diversificação de espécies é resultado de processos evolutivos, mediados por fatores bióticos como populações e comunidades e fatores abióticos como clima, solos e geologia que impactam na história evolutiva do táxon ao longo do tempo, determinando sua filogênese e distribuição (MAZZEI, 2007).

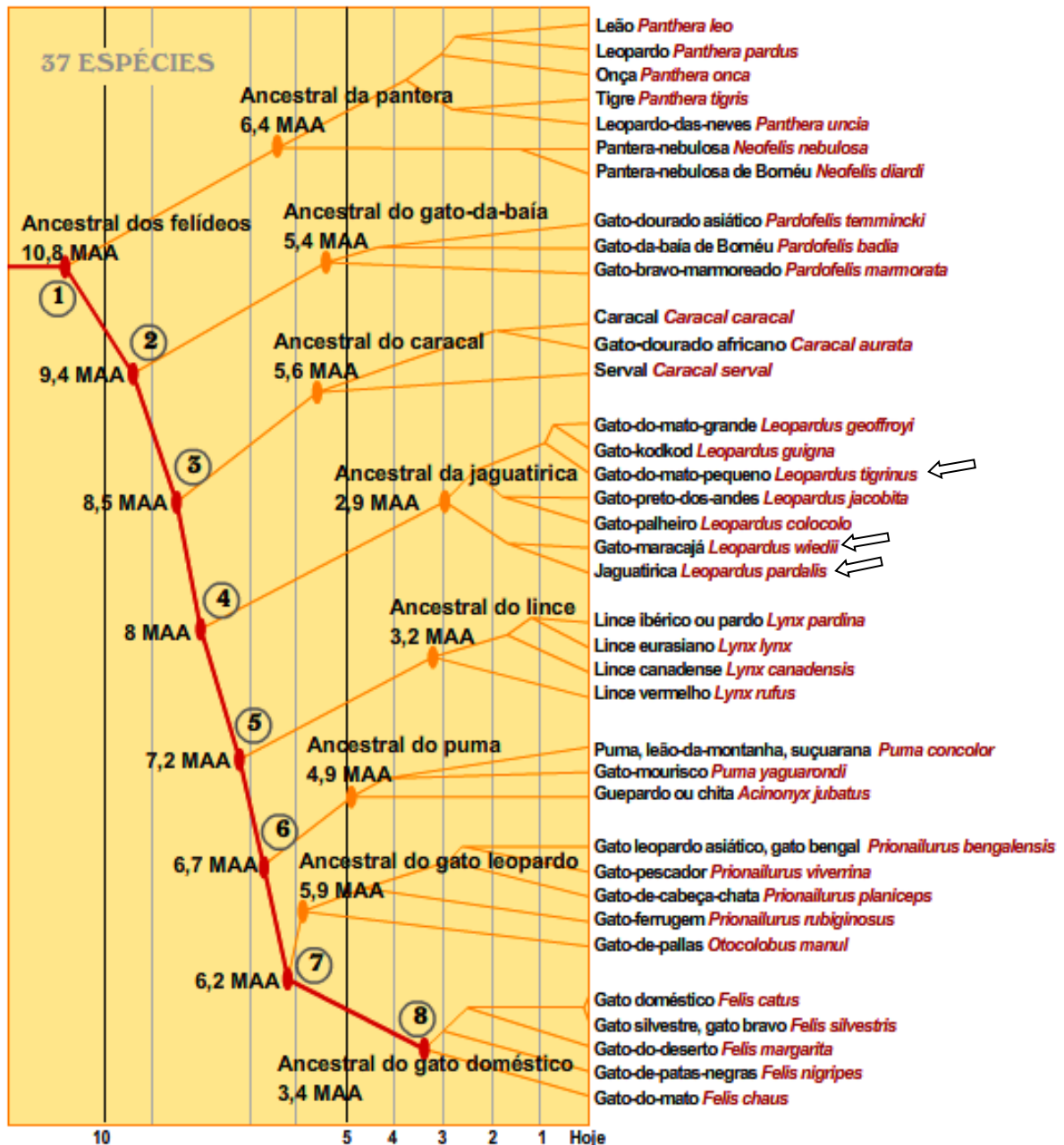


Figura 1 – “The cat family tree” - Linhagens e espécies de felídeos, com suas relações filogenéticas, conforme O’Brien e Johnson (2007).

Os movimentos de massas de terra têm sido uma das características da história da Terra, pelo menos desde o período Proterozóico. A deriva continental tem moldado, em grande parte, a evolução dos vertebrados (LABOURIAU, 1994; POUGH, 2008). Estudos de vertebrados mostram que o isolamento em continentes, ilhas ou outras barreiras naturais proporcionam aquilo que é necessário para a população se distanciar geneticamente de tal forma que duas

populações, mesmo com ancestrais comuns, não se reproduzam mais, caracterizando a especiação (O`BRIEN e JOHNSON, 2007).

Os primeiros carnívoros verdadeiros datam do final do Paleoceno e início do Eoceno, são representados pelo miascídeo *Vulpavus* que, provavelmente, caçava pequenos mamíferos que viviam em árvores (VALKENBURG, 2007). A ordem Carnivora divergiu de seu parente mais próximo Pholidota (pangolins) há 78 milhões de anos. Dentro da ordem Carnivora, os Feliformia (Felidae, Hyenidae, Herpestidae, Viverridae e os extintos Ninravídeos) separaram-se da linhagem Caniformia (Canidae, Odobenidae, Ursidae, Procyonidae, Mustelidae e Phocidae) há 55 milhões de anos (O`BRIEN e JOHNSON, 2005; BENTON, 2008, EIZIRIK *et al.*, 2010).

Carnívoros similares a felídeos apareceram há 35 milhões de anos atrás (JOHNSON *et al.*, 2006). Os felídeos modernos diversificaram durante o Pleistoceno inclusive com algumas extinções (BENTON, 2008; VALKENBURG 2007). As pesquisas de Johnson *et al.* (2006), realizadas com dados moleculares, apontaram que todos os felídeos recentes descendem de apenas uma das várias espécies de *Pseudaelurus*, que viveram na Ásia há 11 milhões de anos (O`BRIEN e JOHNSON, 2007).

O`Brien e Johnson (2007) e Culver *et al.* (2010) apontaram que os felídeos migram porque o seu comportamento faz com que se dispersem a cada geração, pois quando machos e, eventualmente, fêmeas chegam à idade adulta são forçados à abandonar seu local de origem. Felídeos em expansão populacional são obrigados a ocuparem territórios cada vez maiores. Segundo o estudo de Johnson *et al.* (2006) na América do Norte, as linhagens da jaguatirica e do lince divergiram há aproximadamente 8,0 milhões de anos. A linhagem da jaguatirica se dividiu em duas e hoje formam sete espécies que habitam a América, principalmente do Sul.

Na América do Sul atualmente estão presentes dez espécies de felinos: Do grupo da pantera, a onça-pintada (*Panthera onca*), do grupo do puma, o puma (*Puma concolor*) e o gato-mourisco (*Puma jaguarundi*) e do grupo da jaguatirica, o gato-palheiro (*Leopardus colocolo*), gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), gato-maracajá (*Leopardus wiedii*), gato-do-mato-grande (*Leopardus geoffroyi*), jaguatirica (*Leopardus pardalis*), gato-dos-andes (*Leopardus jacobita*) e gato-kodkod (*Leopardus guigna*) e os processos de

formação destas espécies são vistos adiante (JOHNSON *et al.*, 2006; MACDONALD *et al.*, 2010).

Durante a maior parte do Cenozóico, a América do Sul permaneceu como uma ilha, mas três milhões de anos atrás, o Istmo do Panamá se formou e um grande intercâmbio de animais terrestres aconteceu, causando efeitos marcantes (BENTON, 2008). Com a ligação das Américas do Sul e do Norte através do Istmo do Panamá os felídeos migraram para o sul, onde encontraram um ambiente propício para sua sobrevivência e diversificação, com uma fauna de carnívoros pouco competitiva e a abundância da fauna sul-americana. Um exemplo desse processo migratório é o da linhagem da jaguatirica que se diversificou na América do Sul, originando as espécies do gênero *Leopardus* que até hoje sobrevivem na região Neotropical (PREVOSTI, 2006). As espécies jaguatirica (*Leopardus pardalis*), gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*) e gato-maracajá (*Leopardus wiedii*), estudadas neste trabalho, fazem parte desta linhagem.

Jaguatiricas e gatos-maracajás são espécies simpátricas na maioria de suas faixas, ocorrendo em ampla faixa de distribuição, do sul dos Estados Unidos (jaguatirica) ou norte do México (gato-maracajá) para o sul do Brasil e norte da Argentina, entretanto ocupando nichos e capturando presas diferentes. O ponto de separação entre as populações de jaguatiricas e gatos-maracajás do norte e do sul da América do Sul foi considerado o Rio Amazonas, com base nos resultados das análises filogenéticas de DNA mitocondrial (EIZIRIK, 1998).

O gato-do-mato-pequeno está distribuído a partir de Costa Rica (norte) até o sul do Brasil e Argentina. Há registros da bacia Amazônica, mas a distribuição aparenta ser descontínua e irregular. Trigo *et al.* (2013), com base em dados moleculares, propôs uma nova divisão para a espécie: O *Leopardus tigrinus* que vive principalmente no cerrado e na caatinga e a que vive no sul do Brasil chamada de *Leopardus guttulus*, que está no ambiente mais úmido e denso da Mata Atlântica. Foi detectada hibridização em estudos genéticos de *Leopardus geoffroyi* e *L. tigrinus*, que tem ocorrência alopátrica no sul do Brasil (GRISOLIA e MORENO-COTULIO, 2012; TRIGO *et al.*, 2013) e entre *L. tigrinus* e *L. colocolo* no nordeste do Brasil (TRIGO *et al.* 2013).

Os felídeos dispersaram-se nos continentes e ocuparam diferentes biomas, demonstrando uma grande capacidade adaptativa do táxon (O'BRIEN

et al., 2008). A contemporaneidade dos felídeos com a espécie *Homo sapiens* impacta em sua história natural. Felídeos ficam mais suscetíveis à extinção pela alteração da matriz vegetal e restrição de recursos alimentares. A restrição de fluxo gênico e baixas densidades populacionais nos fragmentos preservados impactam na sobrevivência de populações a médio e longo prazo. Estudos indicam que felídeos têm pouca capacidade para se dispersarem através das paisagens dominadas pelo homem, sendo que cada fragmento que possui uma pequena população já sofre os efeitos do isolamento e endogamia (HAAG *et al.* 2010), pois a maioria das populações encontra-se em fragmentos de habitats, entrecortados por rodovias e áreas urbanizadas que restringem seus deslocamentos e impedem ou dificultam a troca gênica entre populações (MAZZEI, 2007).

A diversificação, a migração e a expansão das espécies de felídeos levaram 12 milhões de anos para ocorrer, embora, em termos evolutivos seja considerado um curto espaço de tempo (EIZIRIK, 2010), estudos são necessários para caracterização de dados fisiológicos e para aplicação de técnicas reprodutivas específicas, pois são encontradas diferenças fisiológicas e anatômicas reprodutivas entre espécies evolutivamente próximas (MOREIRA *et al.*, 2001; MORAIS *et al.*, 2002 ; SWANSON, 2006; GENARO *et al.*,2007).

Muitas das espécies de felídeos do mundo tendem a enfrentar as crescentes ameaças à sua sobrevivência na natureza e para algumas espécies as populações cativas podem fornecer um banco de reserva para futuro aumento populacional ou manejo genético. Como as populações da maioria dos zoológicos são originadas a partir de poucos animais, estão sujeitas à perda de variabilidade genética ao longo do tempo, a infusão contínua dos alelos é necessária para evitar as consequências da endogamia (SWANSON *et al.*, 2007). Populações em cativeiro de pequenos felídeos muitas vezes são compostas por menos que 50 indivíduos, que são geograficamente dispersos, tornando-os difíceis de estudar em números cientificamente significativos (SWANSON & WILDT, 1997).

Populações de animais silvestres de todo o planeta têm sofrido ameaças constantes e a consequência direta dessas ameaças é o alto número de espécies ameaçadas de extinção. Jardins zoológicos e outras instituições que

fazem reprodução *ex situ* compartilham a grande responsabilidade de ajudar a prevenir a rápida extinção de espécies silvestres no planeta Terra (MOREIRA, 2001).

Informações fisiológicas básicas são essenciais para o desenvolvimento e aplicação de técnicas de reprodução assistida, como a indução da ovulação, a inseminação artificial (IA), fertilização *in vitro* (FIV), produção *in vitro* e transferência de embriões (PIV e TE) e formação de banco de reserva genômica (modificado de SWANSON & WILDT, 1997).

A capacidade de monitorar a atividade gonadal e adrenal através de análises endócrinas e o monitoramento reprodutivo é fundamental para melhorar a saúde e a eficiência reprodutiva. Isto tem sido possível em grande parte através do desenvolvimento de técnicas não invasivas de monitoramento de esteroides fecais que, atualmente, é o método de escolha para a monitoramento da função endócrina em espécies selvagens, incluindo felídeos (BROWN, 2006). Em cada espécie de felídeo, ensaios de metabólitos hormonais em fezes e análise seminal provaram ser úteis para a caracterização de parâmetros reprodutivos, um pré-requisito necessário para o desenvolvimento de técnicas de reprodução assistida (SWANSON, 2006).

Programas de modelagem nos planos de sobrevivência das espécies sugerem que as populações atuais não são sustentáveis sem a introdução periódica de indivíduos novos, da melhoria dos parâmetros demográficos e tamanhos maiores das populações. As tecnologias de reprodução assistida fornecem os meios para abordar cada um desses desafios de gestão (SWANSON, 2006).

Com base nos trabalhos de TRIGO *et al.* 2013 supõe-se que os exemplares utilizados nesta pesquisa e citados como *L. tigrinus* sejam da espécie *L. guttulus*, pela origem geográfica dos animais utilizados, entretanto, como não foram realizados exames de biologia molecular nestes animais para caracterização taxonômica, se optou por manter a citação da espécie, conforme identificação da mantenedora destes e classificação do ano de 2013, período em que foi realizada a pesquisa.

Esta tese foi dividida em cinco capítulos que foram escritos sob a forma de artigos científicos para publicação em revistas especializadas. Os primeiros testes foram realizados com criopreservação de sêmen nas espécies *L. pardalis*

e *L.tigrinus*, testando diferentes diluentes e curvas de criopreservação. Nestas pesquisas de criopreservação seminal foi testado um protocolo anestésico para contenção química e analgesia durante a eletroejaculação em *L. pardalis*, que havia sido descrito com efetividade para a espécie *L. tigrinus* por Juvenal et al. em 2008. Após os resultados obtidos nestas espécies iniciaram-se os trabalhos em *L. wiedii* para testes de protocolos de criopreservação, utilizando-se a extrapolação dos métodos com os melhores resultados obtidos no gênero pesquisado. Foi proposto um programa de reprodução para os indivíduos cativos de *L.wiedii*, com monitoramento endócrino e reprodutivo dos machos da espécie. Para isso houve a necessidade de validação de testes de detecção de metabólitos fecais de andrógenos e glicocorticoides, fator que gerou uma nova pesquisa associada ao monitoramento endócrino do gênero pesquisado.

Este trabalho avalia a aplicação de biotécnicas reprodutivas nas espécies *Leopardus pardalis*, *Leopardus tigrinus* e *Leopardus wiedii*, a partir de produtos comerciais desenvolvidos para outras espécies, tais como crioprotetores seminais, meios extensores para sêmen, fármacos, equipamentos de criopreservação seminal e *kits* de dosagem hormonais, todos disponíveis comercialmente no Brasil, com o intuito de padronizar o trabalho de campo e tornar acessível o uso destas tecnologias para conservação das espécies.

Referências

BENTON, M.J. **Paleontologia dos vertebrados**. 3 ed. Atheneu. 446 p, 2008.

BROWN, J. L. Comparative endocrinology of domestic and nondomestic felids. **Theriogenology**, v. 66, n. 1, p. 25-36, 2006.

CULVER, M.; DRISCOLL, C.; EIZIRIK, E. AND SPONG, G. Genetic applications in wild felids. In MACDONALD, D.W E LOVERIDGE, A.J. **Biology and Conservation of Wild Felids**. Oxford University Press, p. 107-124, 2010.

EIZIRIK, E.; MURPHY, W.J.; KOEPFLI, K.P.; JOHNSON, W.E.; DRAGOO, J.W.; WAYNE, R.K.; O'BRIEN, S.J. Pattern and timing of diversification of the mammalian order Carnivora inferred from multiple nuclear gene sequences. **Mol Phylogenet Evol**. v. 56-1 p.49-63. 2010.

EIZIRIK, E.; BONATTO, S. L.; JOHNSON, W. E.; CRAWSHAW J. R. P. G.; VIE, J.; BROUSSET, D. M.; O'BRIEN, S. J.; SALZANO, F. M. Phylogeographic patterns and evolution of the mitochondrial DNA control region in two Neotropical

cats (Mammalia, Felidae). **Journal of Molecular Evolution** v.47, p. 613-624. 1998.

GENARO, G., MORAES, W., SILVA, J. C. R., ADANIA, C. H., & FRANCI, C. R. Plasma hormones in Neotropical and domestic cats undergoing routine manipulations. **Research in Veterinary Science**, v.82(2), p.263-270. 2007.

GRISOLIA A.B. & MORENO-COTULIO, V.R.. Molecular markers and genetic diversity in Neotropical felids in Mahmut Caliskan. **Analysis of Genetic Variation in Animals**. Environmental Sciences, 2012. Em: <<http://www.intechopen.com/books/analysis-of-genetic-variation-inanimals/molecular-markers-and-genetic-diversity-in-neotropical-felids>> acessado em 12/12/2013.

HAAG T, SANTOS A. S.; SANA D. A, MORATO R. G.; CULLEN L. JR.; CRAWSHAW P. G. JR.; DE ANGELO, C.; DI BITETTI, M.S.; SALZANO F.M.; EIZIRIK E. The effect of habitat fragmentation on the genetic structure of a top predator: loss of diversity and high differentiation among remnant populations of Atlantic Forest jaguars (*Panthera onca*). **Mol Ecol**. Nov; v.19-22 p. 4906-21. 2010

JOHNSON, W. E., EIZIRIK, E., PECON-SLATTERY, J., MURPHY, W. J., ANTUNES, A., TEELING, E., & O'BRIEN, S. J. The late Miocene radiation of modern Felidae: a genetic assessment. **Science**, v.311(5757), p. 73-77. 2006.

JUVENAL, J. C., ERDMANN R. H., MOREIRA N., MORAES W., CUBAS P.H., DELGADO L.E.S., CARVALHO A. L. E PACHALY J.R. Contenção farmacológica do gato-do-mato-pequeno, *Leopardus tigrinus*, para colheita de sêmen, pela associação de tiletamina zolazepam e xilazina **Pesquisa Veterinária Brasileira**. Rio de Janeiro, v.28, n.11, p.541-546, 2008.

LABOURIAU, M.L.S. **História Ecológica da Terra**, 2 ed. Ed Edgard Blucher, 1994.

MACDONALD, D.W; LOVERIDGE AND KRISTIN NOWELL. Dramatis personae: an introduction to the wild felids. *in* MACDONALD, D.W E LOVERIDGE, A.J. **Biology and Conservation of Wild Felids**. Oxford University Press, p 59-83, 2010.

MAZZEI, K. **Corredores de fauna na região Cantareira Mantiqueira: evidências geográficas**. Tese (Doutorado) Departamento de Geografia, Faculdade de Filosofia, Letras e Ciências Humanas, Universidade de São Paulo FFLCH-USP, São Paulo, 2007.

MORAIS, R.N.; MUCCILOLO, R.G.; GOMES, M.L.F.; LACERDA, O.; MORAES, W.; MOREIRA, N.; GRAHAM, L.H.; SWANSON, W.F.; BROWN, J.L. Seasonal analysis of semen characteristics, serum testosterone and fecal androgens in the ocelot (*Leopardus pardalis*), margay (*L. wiedii*) and tigrina (*L. tigrinus*). **Theriogenology**, p.2027-2041. 2002.

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

MOREIRA, N.; MONTEIRO-FILHO, E. L. A.; MORAES, W. D.; SWANSON, W. F.; GRAHAM, L. H.; PASQUALI, O. L. & BROWN, J. L. Reproductive steroid hormones and ovarian activity in felids of the *Leopardus* genus. **Zoo Biology**, v.20-2 p.103-116. 2001.

NOWELL, K.; JACKSON, P. Wild cats: status survey and conservation action plan. Gland: **IUCN World Conservation Union**, 1996.

O'BRIEN S. J. E JOHNSON W. E. A Evolução dos Gatos. **Scientific American**. Ed 63. 2007. Em: <http://www2.uol.com.br/sciam/reportagens/a_evolucao_dos_gatos.html>, acessado em 21/05/2013.

O'BRIEN, S.J.; JOHNSON, W.; DRISCOLL, C.; PONTIUS, J.; PECON-SLATTERY, J.; J. MENOTTI-RAYMOND. State of cat genomics, **Trends in Genetics**, v. 24, i. 6, June, p. 268-279. 2008.

O'BRIEN, S. J. E JOHNSON, W. E. Big cat genomics. **Annual Reviews of Genomic and Human Genetics**, v. 6, p.407-429, 2005.

POUGH, F. H.; JANIS, C. M.; HEISER, J. B. **A vida dos vertebrados**. 4. ed. — São Paulo : Atheneu Editora, 2008.

PREVOSTI, F. J. New material of Pleistocene cats (Carnivora, Felidae) from Southern South America, with comments on biogeography and the fossil record, **Geobios**, v. 39, i. 5, p. 679-694. 2006

SWANSON W.F, Application of assisted reproduction for population management in felids: The potential and reality for conservation of small cats, **Theriogenology**. v.66 (1) p.49-58, 2006.

SWANSON W.F., MAGAREY G.M., HERRICK J.R. Sperm cryopreservation in endangered felids: developing linkage of in situ-ex situ populations. **SocReprodFertil Suppl**. v.65 p.417-32, 2007.

SWANSON, W. F.; WILDT, D. E. Strategies and progress in reproductive research involving small cat species. **International Zoo Yearbook**, v. 35, n. 1, p. 152-159, 1997.

TRIGO, T. C., SCHNEIDER, A., DE OLIVEIRA, T. G., LEHUGEUR, L. M., SILVEIRA, L., FREITAS, T. R., & EIZIRIK, E. Molecular data reveal complex hybridization and a cryptic species of Neotropical wild cat. **Current Biology**. v.23 n. 24 p. 2528-2533. 2013.

VALKENBURGH B. V. De 'ja'vu: the evolution of feeding morphologies in the Carnivora. **Integrative and Comparative Biology**, v.47, n.1, p.147-163, 2007.

ARTIGO 1 - Contenção farmacológica da jaguatirica, *Leopardus pardalis* (Linnaeus 1758), para coleta de sêmen, pela associação de tiletamina-zolazepam e xilazina

ARTICLE 1 - Chemical restraint of ocelot, *Leopardus pardalis* (Linnaeus 1758), for semen collection with the association of tiletamine-zolazepam and xylazine

Artigo publicado:

Bioscience Journal, Uberlândia, v. 29, Supplement 1, p. 1731-1737, Nov. 2013

Received: 17/09/12

Accepted: 03/12/13

1 **Contenção farmacológica da jaguatirica, *Leopardus pardalis* (Linnaeus 1758), para coleta de**
2 **sêmen, pela associação de tiletamina-zolazepam e xilazina**

3
4 **Chemical restraint of ocelot, *Leopardus pardalis* (Linnaeus 1758), for semen collection with**
5 **the association of tiletamine-zolazepam and xylazine**
6

7 **Resumo**

8 Foram avaliados os efeitos anestésicos da associação de cloridrato de tiletamina (7 mg/kg),
9 cloridrato de zolazepam (7 mg/kg) e cloridrato de xilazina (1 mg/kg), doses calculadas para peso
10 estimado, aplicados por via intramuscular profunda para contenção farmacológica de machos de
11 jaguatirica *Leopardus pardalis* (Linnaeus, 1758) (Felidae), submetidos à coleta de sêmen por
12 eletroejaculação. Quatro animais foram anestesiados em quatro a cinco ocasiões diferentes, com
13 intervalo mínimo de 30 dias, totalizando 17 procedimentos. Em algumas ocasiões, quando a
14 contenção farmacológica inicial não propiciava segurança para a manipulação do animal, foi
15 necessária a aplicação complementar de anestésicos, sendo então administrada 1/3 da dose inicial,
16 fato necessário em apenas três (17,64%) do total de procedimentos. Após a administração das drogas,
17 foram monitorados durante 80 minutos parâmetros como frequência cardíaca, frequência respiratória,
18 temperatura retal, miorelaxamento e nocicepção. O período de latência foi de $3,56 \pm 0,55$ minutos
19 após a injeção e o tempo para recuperação foi de $169,60 \pm 12,37$ minutos. Não foi evidenciada
20 diferença estatística ($p > 0,05$) entre os animais e os momentos avaliados para reações dolorosas,
21 miorelaxamento, bem como para os parâmetros: frequências respiratória e cardíaca e temperatura
22 retal. A associação de tiletamina-zolazepam e xilazina, nas doses de 7mg/kg e 1mg/kg
23 respectivamente, proporcionou uma boa qualidade anestésica, curto período de latência, bom período
24 anestésico hábil e com segurança para a realização do procedimento de eletroejaculação nas
25 jaguatiricas, com boa qualidade do sêmen obtido.

26 **Palavras-chave:** Anestesia. Eletroejaculação. Felídeos. Exame andrológico. Contenção química.

27 **Abstract**

28 The anesthetic effects of tiletamine hydrochloride (7 mg/kg), zolazepam hydrochloride (7
29 mg/kg) and xylazine (1 mg/kg) association, doses calculated by the estimated weight, were evaluated
30 after deep intramuscular injection for pharmacological restraint of male ocelot *Leopardus pardalis*
31 (Linnaeus, 1758) (Felidae), subjected to semen collection by electroejaculation. Four animals were
32 anesthetized on four to five different occasions with an interval of 30 days, totaling 17 procedures. In
33 some instances, when the initial pharmacological restraint was not propitiated safety for handling the
34 animal, it was necessary to apply supplementary anesthetics, and then administered 1/3 of the initial
35 dose, fact necessary only in three procedures (17.64%). After the injection, parameters like heart rate,
36 respiratory rate, rectal temperature, muscle relaxation and nociception was monitored for 80 minutes.
37 The latency period was 3.56 ± 0.55 minutes after injection and the time for recovery was 169.60 ± 12.37
38 minutes. There was no significant statistical difference ($p>0.05$) between the animals and moments
39 evaluated for painful reactions, muscle relaxant, as well as for the parameters: respiratory and heart
40 rates and rectal temperature. The combination of tiletamine-zolazepam and xylazine at doses of
41 1mg/kg and 7mg/kg respectively, provided a good quality of anesthesia, short latency period, good
42 viable anesthetic period and safety to proceed the electroejaculation in ocelots, with good quality of
43 obtained semen.

44 Key words: Anesthesia. Electroejaculation. Felines. Andrologic examination. Chemical restraint.

45

46 **Introdução**

47 A eletroejaculação é o método de eleição para obtenção de sêmen para análise e
48 criopreservação em animais silvestres, visto que estes geralmente não permitem avaliação sem
49 contenção farmacológica devido à sua agressividade ou por não possuírem condicionamento para
50 ejaculação em vagina artificial (MORATO e BARNABE, 1998).

51 Supõe-se que a eletroejaculação cause certo grau de desconforto e sensibilidade muscular pela
52 contração muscular ocasionada pelos estímulos elétricos. Além disso, certos fármacos podem relaxar

53 a musculatura vesical, ocasionando contaminação do sêmen por urina durante a coleta, com perda da
54 motilidade espermática (HOWARD, 1993).

55 Diversos protocolos anestésicos foram propostos para colheita de sêmen em felídeos
56 domésticos e selvagens (PLATZ e SEAGER, 1978; HOWARD, 1993; SELMI et al., 2001; AXNÉR
57 e LINDE-FORSBERG, 2002 e SWANSON et al., 2003), porém alguns pesquisadores relataram
58 problemas na realização do procedimento. Dificuldades como contaminação por urina, diminuição
59 no volume do ejaculado, ejaculação retrógrada para a bexiga, planos anestésicos inadequados e
60 ineficácia de algumas coletas estão entre os problemas mais citados (MORAIS et al., 2002;
61 QUEIROZ, 2003 e TEBET, 2004).

62 A ênfase no estudo da reprodução em felídeos foi motivada pela necessidade urgente de
63 conservar espécies ameaçadas (CHATDARONG et al., 2006). Estudos para promover segurança
64 anestésica e eficácia na obtenção de amostras biológicas são fundamentais. Para tanto, é essencial
65 que sejam estabelecidos protocolos de contenção farmacológica espécie-específica, os quais
66 congreguem praticidade, eficácia, segurança e custo baixo, viabilizando a coleta com baixos índices
67 de contaminação do sêmen (JUVENAL et al., 2008).

68 A aplicação desses avanços na área de reprodução assistida visa principalmente os programas
69 *in situ* e *ex situ* de conservação das espécies de felídeos ameaçadas, com a finalidade de se obter mais
70 filhotes de pais selecionados, assim, garantindo a variabilidade genética e reduzindo o intervalo entre
71 gerações (VILLAVERDE e LOPES, 2007).

72 Neste experimento foram avaliados os efeitos anestésicos, cardiovasculares e eficiência da
73 coleta de sêmen da associação de cloridrato de tiletamina-zolazepam e cloridrato de xilazina em
74 jaguatiricas.

75

76 **Material e métodos**

77 Foram utilizados quatro machos adultos de jaguatirica (*Leopardus pardalis*), escolhidos
78 aleatoriamente, com peso médio de $12,47 \pm 1,28$ kg, pertencentes ao plantel do Criadouro de Animais

79 Selvagens da Itaipu Binacional (CASIB), em Foz do Iguaçu, Paraná (25°32'45"Sul, 54°53'07" Oeste).
80 Cada animal foi submetido de quatro a cinco diferentes coletas, com um intervalo mínimo de 30 dias
81 entre cada.

82 Os animais permaneceram em jejum alimentar de 12 horas prévio ao procedimento.
83 Formulou-se um protocolo anestésico, utilizando doses de 7 mg/kg de tiletamina-zolazepam (Zoletil
84 50, Virbac do Brasil, São Paulo - Brasil) e 1 mg/kg de xilazina (Rompun, Bayer Saúde Animal, São
85 Paulo – Brasil), doses calculadas para peso estimado. Para possibilitar a injeção dos fármacos, os
86 animais foram contidos fisicamente no recinto utilizando-se puçá. As doses indicadas a cada paciente
87 foram acondicionadas conjuntamente em seringas providas de agulhas hipodérmicas. Assim que o
88 animal apresentava-se fisicamente contido, realizou-se injeção intramuscular da associação calculada
89 para o peso estimado, sendo a injeção realizada profundamente na musculatura da face lateral da
90 coxa. Após sedação, os animais foram imediatamente pesados para obtenção do peso corpóreo real.

91 Em algumas ocasiões, quando a contenção farmacológica inicial não propiciava segurança
92 para manipulação do animal, foi necessária a aplicação complementar de anestésicos, sendo então
93 administrado 1/3 da dose inicial.

94 O exame anestesiológico consistiu da avaliação da nocicepção e do miorelaxamento aos 10,
95 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 minutos após a injeção (MPI). A nocicepção foi testada por meio da resposta
96 ao pinçamento da segunda falange de um dígito dos membros torácico e pélvico esquerdos com pinça
97 hemostática sem catraca e com as extremidades revestidas por manguitos de borracha. A pinça foi
98 ocluída até percepção de compressão intensa do dígito, e tal procedimento foi sempre realizado pelo
99 mesmo avaliador.

100 Os animais foram monitorados, sendo aferidos a cada 10 minutos os valores das frequências
101 cardíaca e respiratória, pulso, avaliação algimétrica por compressão de periósteo em falanges de
102 membros pélvicos e torácicos (padronizados como A – ausência dolorosa, B – leve sensibilidade
103 dolorosa e C – com sensibilidade dolorosa), grau de relaxamento muscular (mensurados como A –
104 relaxamento total, B – relaxamento parcial e C – ausência de relaxamento) conforme descrito por

105 Pachaly (1998), reflexos córneo-palpebrais e nível de consciência, até que os animais obtivessem alta
106 anestésica, quando então eram devolvidos ao recinto original.

107 Em todos os animais submetidos à anestesia realizou-se colheita de sêmen por
108 eletroejaculação, segundo o método proposto por Howard (1993). Avaliou-se a taxa de eficácia de
109 obtenção de ejaculado em cada série de estímulos e a incidência de contaminação da amostra com
110 urina.

111 Na análise estatística foi utilizada ANOVA para comparação dos dados paramétricos entre os
112 animais e os diferentes momentos, empregando teste *post-hoc* de Tukey-Kramer, exceto para a
113 avaliação algimétrica, também comparada entre os animais e momentos de mensuração, em que foi
114 empregado o teste qui-quadrado, adotando-se o nível de confiança de 95%.

115

116 **Resultados**

117 Foram realizados 17 procedimentos anestésicos em quatro jaguatiricas. O período de latência
118 foi de $3,56 \pm 0,55$ minutos após a injeção e o tempo para recuperação foi de $169,60 \pm 12,37$ minutos.
119 A dose total dose anestésico utilizado, corrigido para o peso real dos animais foi $6,28 \pm 0,88$ mg/kg
120 para tiletamina+zolazepam e $0,98 \pm 0,15$ mg/kg para xilazina.

121 Não foi evidenciada diferença estatística ($p > 0,05$) tanto entre os animais quanto momentos
122 avaliados para reações dolorosas (Tabela 1), miolorrelaxamento (Tabela 2), bem como para os valores
123 paramétricos anotados – frequências respiratória e cardíaca e temperatura retal (Tabela 3).

124 Nas situações em que os animais apresentaram plano anestésico superficial, com
125 miolorrelaxamento ou sensibilidade dolorosa classificados com o escore C, antes ou durante o
126 procedimento de eletroejaculação, administrou-se dose suplementar da associação anestésica,
127 calculada em 1/3 da dose inicial. Essa dose suplementar foi necessária em três procedimentos.

128

129 Tabela 1. Reações de sensibilidade dolorosa observadas em 17 procedimentos realizados em quatro exemplares de
130 jaguatirica (*Leopardus pardalis*) durante o tempo de anestesia, utilizando-se a associação tiletamina-zolazepam ($6,28 \pm 0,8$
131 mg/kg) e xilazina ($0,98 \pm 0,15$ mg/kg) para coleta de sêmen por eletroejaculação.

	Sensibilidade de membro torácico			Sensibilidade de membro pélvico			
	A sem sensibilidade	B pouca sensibilidade	C com sensibilidade	A sem sensibilidade	B pouca sensibilidade	C com sensibilidade	
10 min	70,6%	11,76%	17,64%	10 min	88,24%	11,76%	0%
20 min	94,12%	5,88%	0%	20 min	94,12%	5,88%	0%
30 min	94,12%	5,88%	0%	30 min	94,12%	5,88%	0%
40 min	100%	0%	0%	40 min	100%	0%	0%
50 min	100%	0%	0%	50 min	100%	0%	0%
60 min	100%	0%	0%	60 min	100%	0%	0%
70 min	94,12%	5,88%	0%	70 min	100%	0%	0%
80 min	88,24%	11,76%	0%	80 min	88,24%	11,76%	0%
N = 17. $\alpha = 0,05$. G.L = 2. $X^2 = 4,36$.			N = 17. $\alpha = 0,05$. G.L = 2. $X^2 = 3,98$.				

132

133 Tabela 2: Miorrelaxamento observado em 17 procedimentos realizados em quatro exemplares de jaguatirica (*Leopardus*
134 *pardalis*) durante o tempo de anestesia, utilizando-se a associação tiletamina-zolazepam ($6,28 \pm 0,8$ mg/kg) e xilazina
135 ($0,98 \pm 0,15$ mg/kg) para coleta de sêmen por eletroejaculação.

	Qualidade do miorelaxamento		
	A (relaxado)	B (parcial)	C (não relaxado)
10 min	88,24%	11,76%	0%
20 min	94,12%	5,88%	0%
30 min	94,12%	5,88%	0%
40 min	100%	0%	0%
50 min	100%	0%	0%
60 min	100%	0%	0%
70 min	88,24%	11,76%	0%
80 min	94,12%	5,88%	0%
N = 17. $\alpha = 0,05$. G.L = 2. $X^2 = 4,12$.			

136

137

138

139

140

141 Tabela 3. Valores de frequência cardíaca (FC), respiratória (FR) e temperatura retal (T°C), observados em 17
142 procedimentos realizados em quatro exemplares de jaguatirica (*Leopardus pardalis*) durante o tempo de anestesia,
143 utilizando-se a associação tiletamina-zolazepam ($6,28 \pm 0,8$ mg/kg) e xilazina ($0,98 \pm 0,15$ mg/kg) para coleta de sêmen por
144 eletroejaculação.

Tempo (min)	FC (bpm)	FR (mpm)	T°C
10	105,39 ± 12,96 ^{aA}	20,39 ± 10,54 ^{bB}	37,79 ± 0,69 ^{cC}
20	97,67 ± 15,65 ^{aA}	19,06 ± 9,23 ^{bB}	37,89 ± 0,92 ^{cC}
30	98,78 ± 12,05 ^{aA}	15,5 ± 6,46 ^{bB}	38,75 ± 0,91 ^{cC}
40	97,61 ± 14,09 ^{aA}	17,89 ± 7,00 ^{bB}	38,99 ± 0,78 ^{cC}
50	99,06 ± 11,18 ^{aA}	19,11 ± 7,11 ^{bB}	39,35 ± 0,88 ^{cC}
60	96,23 ± 14,94 ^{aA}	21,46 ± 7,41 ^{bB}	38,36 ± 0,96 ^{cC}
70	91,08 ± 10,08 ^{aA}	23,33 ± 9,76 ^{bB}	37,86 ± 0,69 ^{cC}
80	88,9 ± 11,11 ^{aA}	23,73 ± 9,48 ^{bB}	37,33 ± 1,12 ^{cC}

145 Médias seguidas de letras minúsculas iguais na mesma coluna não apresentam diferença significativa ($P>0,05$) entre os
 146 animais avaliados. Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma coluna não apresentam diferença significativa
 147 ($P>0,05$) entre os momentos avaliados.

148

149 **Discussão**

150 Os valores encontrados para frequência cardíaca estiveram dentro de parâmetros descritos por
 151 outros autores em anestésias de felídeos. Pachaly et al. (2002a) descreveram valores de $122,13\pm 16,55$
 152 bpm (batimentos por minuto) para frequência cardíaca em gatos-maracajá (*Leopardus wiedii*)
 153 anestesiados com protocolo similar. Juvenal et al. (2008) observaram frequência cardíaca de
 154 $135,64\pm 5,41$ bpm para gatos-do-mato-pequeno. Cistola et al. (2004) encontraram valores de 156 ± 19
 155 bpm para frequência cardíaca de gatos domésticos submetidos à anestesia dissociativa.

156 As médias das frequências respiratórias mantiveram-se dentro de níveis aceitáveis para o
 157 procedimento anestésico, embora tenham sido relatadas frequências respiratórias um pouco maiores
 158 para o gato-maracajá (*Leopardus wiedii*) - $29,87\pm 7,23$ mpm (PACHALY et al., 2002a) - e menores
 159 para o gato doméstico (*Felis catus*) - 18 ± 8 mpm (CISTOLA et al., 2004).

160 Durante a eletroejaculação ocorreu um pequeno aumento da temperatura retal, sem
 161 significância estatística. Este pode ser justificado pela contração muscular, ocorrendo redução da
 162 temperatura subsequente ao evento.

163 Com a dose de $6,28\pm 0,8$ mg/kg, utilizada neste trabalho foi obtido um plano anestésico
 164 apropriado para jagatiricas. Swanson et al. (2003) relataram utilização da associação de tiletamina e
 165 zolazepam ($5,0$ a $10,0$ mg/kg) para colheita de sêmen em felídeos neotropicais [puma (*Puma*

166 *concolor*), gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), gato-maracajá (*Leopardus wiedii*) e
167 jaguatirica (*Leopardus pardalis*)], informando que tal protocolo produziu plano anestésico adequado
168 para eletroejaculação em todas as espécies, com exceção do puma (*Puma concolor*) e do gato-
169 mourisco (*Puma yagouaroundi*).

170 Tebet (2004) descreveu coleta de sêmen por eletroejaculação em felídeos utilizando um dos
171 seguintes protocolos: 1) cloridrato de cetamina (15 mg/kg) e midazolam (0,5 mg/kg); 2) cloridrato de
172 cetamina (15 mg/kg), midazolam (0,5 mg/kg) e tartarato de butorfanol (0,2 mg/kg); 3) Cloridrato de
173 tiletamina/zolazepam (10 mg/kg), mantendo a anestesia com isoflurano inalatório, sendo que 53%
174 dos ejaculados em gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*) e 59% em jaguatirica (*Leopardus*
175 *pardalis*) apresentaram contaminação por urina em pelo menos uma das séries. Apesar de não
176 comparar os diferentes protocolos, a autora observou que animais em planos muito profundos ou
177 superficiais e nos quais se utilizou tartarato de butorfanol, a incidência de contaminação por urina foi
178 maior. Este fato corrobora que o uso de opioides interfere no relaxamento vesical, com elevação da
179 taxa de contaminação da amostra. A analgesia com alfa-2 agonistas adrenérgicos, para
180 eletroejaculação, apresenta uma taxa menor de interferências na qualidade do sêmen, provavelmente
181 por diminuir o grau de contração abdominal durante o estímulo elétrico, com menor grau de
182 relaxamento do esfíncter vesical externo. Este fato pode ser evidenciado no estudo, constatando-se
183 ausência de contaminação em 100% das amostras.

184 Silva et al. (2008) avaliaram quatro protocolos de anestesia para a coleta de sêmen por
185 eletroejaculação em gatos domésticos. Os gatos foram anestesiados com os seguintes protocolos: 1)
186 cetamina (15 mg/kg) e xilazina (1 mg/kg), 2) tiletamina-zolazepam (15 mg/kg), 3) tiletamina-
187 zolazepam (15 mg/kg) e tramadol (2 mg/kg) e 4) isoflurano inalatório. O sucesso na obtenção de
188 ejaculado foi de 84,62%, 92,31%, 92,31% e 100%, respectivamente. Os autores reforçam, contudo,
189 a necessidade de equipamentos específicos e de um profissional capacitado para utilização da
190 anestesia inalatória. Neste estudo em gatos, os autores, diferentemente do empregado nas jaguatiricas,
191 não associaram xilazina à anestesia com tiletamina-zolazepam.

192 Avaliando a segurança e analgesia em quatro diferentes protocolos anestésicos para
193 eletroejaculação em gatos domésticos, Silva et al. (2011), ao comparar os protocolos constituídos por
194 1) cetamina (15 mg/kg) e xilazina (1 mg/kg), 2) tiletamina-zolazepam (15 mg/kg), 3) tiletamina-
195 zolazepam (15 mg/kg) e cloridrato de tramadol (2 mg/kg) e isoflurano inalatório, após indução com
196 cetamina (15 mg/kg) e diazepam (1 mg/kg), apontaram a anestesia inalatória como mais eficaz para
197 prevenir a dor durante o procedimento, bem como com o menor tempo de recuperação anestésica.
198 Entretanto, Queiroz (2003) demonstrou considerável taxa de contaminação do sêmen com o emprego
199 do isoflurano inalatório.

200 As descrições de obtenção de ejaculado na coleta por eletroejaculação são de 100% de eficácia
201 na onça pintada (*Panthera onca*), com protocolo constituído pela associação de tiletamina e
202 zolazepam (MORATO et al., 1998), 100% no gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), com
203 emprego da tiletamina-zolazepam e xilazina (ERDMANN et al., 2005) e 80% de eficácia no gato
204 doméstico, com indução anestésica por propofol e anestesia epidural com lidocaína (LEITE et al.,
205 2006). Neste trabalho obteve-se taxa de 100% de eficácia com o protocolo utilizado nas jaguatiricas.

206 Queiroz (2003) realizou coletas de sêmen em jaguatiricas por eletroejaculação com protocolo
207 anestésico utilizando tiletamina-zolazepam (5 a 10 mg/kg) e manutenção anestésica com isoflurano.
208 Obteve dessa forma uma taxa de 75% de contaminação por urina em pelo menos uma fração do
209 ejaculado e em 53% dos animais foi necessária suplementação anestésica a partir da dose inicial. De
210 forma contrária, com a aplicação do protocolo constituído de tiletamina-zolazepam associado à
211 xilazina, relatado no presente estudo, encontrou-se a necessidade de suplementação da dose em
212 apenas 17,64% dos procedimentos.

213 O miorelaxamento e a sensibilidade dolorosa, entre momentos anteriores e durante a
214 eletroejaculação, que ocorreu dos 40 aos 60 minutos, mantiveram-se regularmente avaliados na
215 categoria A (ausência dolorosa e relaxamento ótimo), caracterizando a eficácia do protocolo em abolir
216 a dor durante a colheita de sêmen. Chatdarong et al. (2006), ao utilizarem a anestesia geral por
217 propofol em gatos domésticos para a coleta de sêmen, evidenciaram que, apesar do excelente

218 relaxamento muscular, e da manutenção constante dos valores paramétricos, este protocolo não foi
219 suficiente para reduzir o estresse gerado aos animais durante o procedimento. Os autores
220 recomendaram a adição de fármacos analgésicos ao protocolo anestésico. Segundo Zambelli et al.
221 (2007), a adição de uma droga alfa2-agonista à anestesia dissociativa possibilitou um aumento na
222 concentração de espermatozoides obtidos por ejaculado em gatos domésticos, sem aumento
223 significativo no fluxo retrógrado de sêmen. De forma equivalente, neste trabalho, o uso da xilazina
224 propiciou sucesso em todas as séries de eletroejaculação com a ausência de contaminação das
225 amostras com urina.

226 Mesmo não utilizando sulfato de atropina na associação anestésica, não foi observado êmese
227 nem sialorreia nos animais. Esta informação não corrobora com o observado em gatos domésticos
228 por Gross (2003), que afirma que doses de 1 mg/kg de xilazina isolada provoca vômitos na grande
229 maioria dos gatos após 3 a 5 minutos da aplicação. Porém, os achados corroboram com o que Juvenal
230 et al. (2008) evidenciaram em gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), em que, de 12 animais,
231 apenas um apresentou sialorreia e houve um único caso de êmese.

232 Pachaly et al. (2002b) relataram uma única intercorrência em gato-do-mato-pequeno, após a
233 utilização de tiletamina-zolazepam, com quadro de distúrbio psicomotor incluindo tremores,
234 diminuição da sensopercepção e ataxia, com reversão posterior. Não foram observadas reações
235 adversas nas jaguatiricas deste estudo.

236

237 **Conclusão**

238 A associação de tiletamina-zolazepam e xilazina, nas doses de 7mg/kg e 1mg/kg
239 respectivamente, proporcionou boa qualidade anestésica e segurança para a realização do
240 procedimento de eletroejaculação em jaguatiricas. O curto período de latência da associação
241 anestésica é particularmente interessante para minimizar os efeitos do estresse causado nos animais.
242 A duração do efeito anestésico permite a manipulação dos animais por períodos relativamente longos,
243 mesmo com a aplicação de uma única dose.

244

245 **Referências**

246 AXNÉR, E.; LINDE-FORSBERG, C. **Semen collection and assessment, and artificial**
247 **insemination in the cat.** In: Concannon P.W., England G., Verstagen J. & Linde-Forsberg C. (Ed.),
248 Recent Advances in Small Animal Reproduction. International Veterinary Information Service,
249 Ithaca, New York. Disponível em: <http://www.ivis.org>. (Acesso em 15 de agosto de 2011) 2002.

250

251 CHATDARONG, K.; PONGLOWHAPAN, S.; MANEE-IN, S.; PONGPHET, K. The use of
252 propofol for electroejaculation in domestic cats. **Theriogenology**, Los Altos, v.66, p.1615-1617,
253 2006.

254

255 CISTOLA A.M., GOLDBERGER F.J., CENTONZE L.A., MCKAY L.W., LEVY J.K. Anesthetic and
256 physiologic effects of tiletamine, zolazepam, ketamine, and xylazine combination (TKX) in feral cats
257 undergoing surgical sterilization. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. Wiltshire, v.6, n.5,
258 p.297-303, 2004.

259

260 ERDMANN, R. H; JUVENAL, J. C.; MORAES, W.; CUBAS, P.; CARVALHO, A. L.; MOREIRA,
261 N. Estudo reprodutivo em gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*, Schreber, 1775). **Archives of**
262 **Veterinary Science**, Curitiba, v.10, n.2, p. 75-79, 2005.

263

264 GROSS M.E. **Tranquilizantes, agonistas α 2-adrenérgicos e agentes relacionados**, In: ADAMS
265 H.R. Farmacologia e Terapêutica em Medicina Veterinária. 1.ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro,
266 2003. p.249-284.

267

268 HOWARD J.G. **Semen collection and analysis in nondomestic carnivores**, In: FOWLER M.E.,
269 Zoo and Wild Animal Medicine. 3rd ed. W.B. Saunders: Philadelphia, 1993. p.390-399.

270

271 JUVENAL, J. C., ERDMANN R. H., MOREIRA N., MORAES W., CUBAS P.H., DELGADO
272 L.E.S., CARVALHO A. L. E PACHALY J.R. Contenção farmacológica do gato-do-mato-pequeno,
273 *Leopardus tigrinus*, para colheita de sêmen, pela associação de tiletamina zolazepam e xilazina
274 **Pesquisa Veterinária Brasileira**. Rio de Janeiro, v.28, n.11, p.541-546, 2008.

275

276 LEITE, D. K. V. H.; PIRES, M. V. M.; SUZANO, S. M. C.; LISBOA, D.; SILVEIRA, A. M.;
277 FERREIRA, A. M. R. Avaliação da coleta de sêmen pelo método de eletroejaculação no gato doméstico
278 (*Felis catus*). **Revista da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, Seropédica, v. 26,
279 suplemento, p. 361-362, 2006.

280

281 MORAIS, R. N.; MUCCILOLO, R. G.; GOMES, M. L. F.; LACERDA, O.; MORAES, W.;
282 MOREIRA, N.; GRAHAM, L. H.; SWANSON, W.F.; BROWN, J. L. Seasonal analysis of semen
283 characteristics, serum testosterone and fecal androgens in the ocelot (*Leopardus pardalis*), margay
284 (*L. wiedii*) and tigrina (*L. tigrinus*). **Theriogenology**, Los Altos, v. 57, n. 8, p. 2027-2041, 2002.

285

286 MORATO, R. G.; BARNABE, R. C. Biotécnicas de Reprodução Aplicadas à Preservação de Felídeos
287 Selvagens. **Clínica Veterinária**, São Paulo, v. 12, p. 24-26, 1998.

288

289 MORATO, R. G.; GUIMARÃES, M. A. B. V.; NUNES, A. L. V.; CARCIOFI, A. C.; FERREIRA,
290 F.; BARNABE, V. H.; BARNABE, R. C. Colheita e avaliação do sêmen em onça pintada (*Panthera*
291 *onca*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 35, n.4, p.
292 178-181, 1998.

293

294 PACHALY, J.R. **Contenção da cutia *Dasyprocta azarae* (Rodentia: Mammalia), pela associação**
295 **do cloridrato de cetamina, cloridrato de xilazina e sulfato de atropina – Definição de protocolos**

- 296 **posológicos individuais com base em extrapolação alométrica interespecífica.** 1998, 130f. Tese
297 (Doutorado em Zoologia). Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Curitiba,
298 1998.
- 299
- 300 PACHALY, J. R. ; BELETTINI, S. T. ; NEVES, A. E. G. ; DELGADO, L. E. S. ; CIFFONI, E. M.
301 G. Anesthesia of a margay (*Leopardus wiedii*) with allometrically scaled doses of tiletamine,
302 zolazepam, xylazine and atropine - Case report. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da**
303 **Unipar**, Umuarama, v. 5, n. 2, p. 333, 2002.
- 304
- 305 PACHALY, J. R. ; MORAES, W. ; CIFFONI, E. M. G. ; LUCZINSKI, T. C. ; AVILA JR, R. H.
306 Adverse reactions to tiletamine in *Leopardus tigrinus* (little spotted cat) – Case report. **Arquivos de**
307 **Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar**, Umuarama, v. 5, n. 2, p. 331, 2002b.
- 308
- 309 PLATZ JR C.C. & SEAGER W.J. Semen collection by electroejaculation in the domestic cat.
310 **Journal of American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, n.173, v.10, p.1353-1355,
311 1978.
- 312
- 313 QUEIROZ, V.S. **Estudo do efeito das condições de manipulação do sêmen de jaguatiricas**
314 **(*Leopardus pardalis* Linnaeus, 1758) sobre a capacitação e a integridade morfológica e funcional**
315 **dos espermatozoides. 2003, 130f.** Dissertação (Mestre em Medicina Veterinária). Pós-graduação em
316 reprodução animal Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo,
317 São Paulo, 2003.
- 318
- 319 SELMI, A.L.; MENDES, G.M.; FIGUEIREDO, J.P.; BARBUDO-SELMÍ, G.R.; MORATO, R.G.;
- 320 MCMANUS, C. **Efeitos cardiovasculares da associação**
- 321 **tiletamina/zolazepam/romifidina/atropina em onças-pintadas (*Panthera onca*): resultados**

322 **preliminares.** 2001 In: V Congresso e X Encontro da Abravas. São Paulo. Anais... São Paulo:
323 Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens, 2001, p.61.

324

325 SILVA, T.F.P.; SILVA, L.D.M.; DIAS, C.G.A.; CARDOSO, J.F.S.; UCHOA, D.C.;
326 ACKERMANN, C.L.; PINEHIRO, F.T.S.; BRILHANTE, D.F.M.; CARNEIRO, R.D.;
327 TAVERNEZI, L.; QUINTO, H. R.; SILVA, L.D.M. Comparação de quatro protocolos anestésicos
328 para a coleta de sêmen por eletroejaculação em gatos domésticos. **Ciência Animal**, Fortaleza, v.18,
329 n.1, p.15-23, 2008.

330

331 SILVA, T.F.P.; DIAS, C.G.A.; ACKERMANN, C.L.; PINHEIRO, F.T.S.; BRAGA, A.C.P.; SILVA,
332 L.D.M. Avaliação de segurança e analgesia de protocolos anestésicos para eletroejaculação em gatos
333 domésticos (*Felis catus*). **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.12, n.3, p.497-505, 2011.

334

335 SWANSON, W.F.; JOHNSON, W.E.; CAMBRE, R.C.. Reproductive status of endemic felid species
336 in Latin American zoos and implications for *ex situ* conservation. **Zoo Biology**. New Jersey, v.22,
337 p.421-441, 2003.

338

339 **TEBET, M.J. Efeito da criopreservação sobre a célula espermática em três espécies de felídeos:**
340 **O gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), a jaguatirica (*Leopardus pardalis*) e o gato**
341 **doméstico (*Felis catus*).** 2004, 116f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal). Universidade
342 Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Botucatu, 2004.

343

344 VILLAVERDE, A.I.S.B; LOPES, M.D. Inseminação artificial em gatos domésticos utilizando sêmen
345 criopreservado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, n.1, p.77-83,
346 2007.

347

348 ZAMBELLI D.; CUNTO, M.; PRATI, F.; MERLO, B. Effects of ketamine or medetomidine
349 administration on quality of electro-ejaculated sperm and on sperm flow in the domestic cat.
350 **Theriogenology**, Los Altos, v.68, p.796-803, 2007

351

ARTIGO 2 - Avaliação de protocolos para criopreservação de sêmen de jaguatiricas (*Leopardus pardalis* Lineaus, 1758).

ARTICLE 2 - Semen cryopreservation protocols evaluation in ocelots (*Leopardus pardalis* Lineaus, 1758).

Artigo formatado nas normas:

Bioscience Journal

ISSN 1516-3725

1 **Avaliação de protocolos para criopreservação de sêmen de jaguatiricas (*Leopardus pardalis***
2 **Linnaeus, 1758)**

3 **Semen cryopreservation protocols evaluation in ocelots (*Leopardus pardalis* Linnaeus, 1758)**

4

5 **Resumo**

6 A jaguatirica (*Leopardus pardalis* Linnaeus 1758) é um felídeo que enfrenta desafios a sua
7 sobrevivência pela destruição de habitats e fluxo gênico restrito tanto *in situ* quanto *ex situ*. A
8 inseminação artificial é uma técnica de reprodução assistida que pode contribuir na conservação da
9 espécie, mas demanda estudos para incrementos na eficiência. Este trabalho relata a criopreservação
10 de sêmen de *L.pardalis* (n=4) com cinco coletas cada animal, segundo protocolo de eletroejaculação
11 descrito por Howard (1993). Foram avaliados três protocolos para criopreservação seminal: (1)
12 diluente *AndroMed*[®] *CSS single step* (Minitub, Tiefenbach, Alemanha) associado à curva de
13 congelação em equipamento automatizado *TK 3000*[®] (*TK Reprodução*, Uberaba - MG, Brasil); (2)
14 diluente *Test Yolk Buffer*[®] (Irvine Scientific, Santa Ana, Ca, EUA) associado à curva de congelação
15 em equipamento automatizado *TK 3000*[®], (*TK Reprodução*, Uberaba-MG, Brasil) (3) diluente *Test*
16 *Yolk Buffer*[®] (Irvine Scientific, Santa Ana, Ca, EUA) associado à curva com resfriamento em
17 geladeira e congelação em caixa de isopor. As amostras de sêmen coletadas apresentaram volume
18 médio (\pm erro padrão da média) de $1,27 \pm 0,14$ ml, com $212,59 \pm 34,63 \times 10^6$ espermatozoides com
19 motilidade progressiva em cada coleta e índice de motilidade espermática (IME) igual a $74,84 \pm 1,46$.
20 O índice de espermatozoides com morfologia normal encontrado foi de $79,15 \pm 2,48$ %. O sêmen foi
21 descongelado em água a 37°C por 30 segundos e avaliado logo em seguida, nova avaliação foi
22 realizada após sofrer diluição, centrifugação e ressuspensão em meio *Modified HTF Medium with*
23 *Gentamicin – Hepes* (Irvine Scientific, Santa Ana, Ca, EUA) (HTF-Hepes). Os índices de motilidade
24 espermática (IME) no sêmen descongelado apontam resultados favoráveis ($p=0,004$) para protocolo
25 TYB-TK ($57,94 \pm 2,10$) e Andromed-TK ($50,59 \pm 3,86$) em relação ao protocolo TYB-GEL ($36,17$
26 $\pm 4,93$) indicando a eficiência do uso do equipamento automatizado. O sêmen quando processado,

27 centrifugado e ressuspensão com o meio de cultivo HTF-Hepes, apresentou melhor IME em relação
28 aos demais protocolos ($p < 0,0001$) com TYB-TK ($57,35 \pm 2,50$) comparado ao TYB-GEL ($33,68 \pm$
29 $5,44$) e Andromed-TK ($23,67 \pm 4,44$), mas sem diferença estatística ($p = 0,571$) quanto à integridade
30 acrossômica. Isso demonstra que o sêmen criopreservado com o meio Andromed sofreu redução de
31 motilidade e vigor, quando ressuspensão com meio de cultivo celular HTF-Hepes antes da
32 inseminação.

33

34 **Abstract**

35 The ocelot (*Leopardus pardalis* Linnaeus 1758) is a felid that have challenges for survival by
36 habitat destruction and restricted gene flow both in situ and ex situ. Artificial insemination is an
37 assisted reproduction technique that can contribute to the species conservation, but demand studies
38 to increase in quality. This paper reports the semen cryopreservation of *L. pardalis* ($n = 4$ captive
39 males, collected five times), according to the electroejaculation protocol described by Howard (1993).
40 Three protocols for semen cryopreservation were evaluated (1) diluent Andromed® CSS single step
41 (Minitub, Tiefenbach, Alemanha) associated with the freezing curve in automated equipment TK
42 3000®, (TKReprodução, Uberaba - MG, Brazil); (2) Test Yolk Buffer® (Irvine Scientific, Santa
43 Ana, Ca, EUA) associated with the freezing curve in automated equipment TK 3000®,
44 (TKReprodução, Uberaba - MG, Brazil) (3) diluent Test Yolk Buffer® (Irvine Scientific, Santa Ana,
45 Ca, USA) associated with the curve when cooling in the refrigerator and freezing in an icebox. Semen
46 samples collected had an average (\pm standard error of the mean) volume of 1.27 ± 0.14 ml, with
47 $212.59 \pm 34.63 \times 10^6$ spermatozoa with progressive motility and sperm motility index (SMI) equal
48 to 74.84 ± 1.46 . The rate of sperm with normal morphology was $79.15 \pm 2.48\%$. The semen was
49 thawed in water at 37°C for 30 seconds and evaluated soon after, a new assessment was performed
50 after dilution, centrifugation and resuspension in Modified HTF Medium with Gentamicin - HEPES
51 (Irvine Scientific, Santa Ana, Ca, USA) (HTF - Hepes). The sperm motility index (SMI) in thawed
52 semen indicate favorable outcomes ($p = 0.004$) for TYB-TK (57.94 ± 2.10) and Andromed-TK (50.59

53 ± 3.86) compared to the protocol TYB-GEL (36.17 ± 4.93) indicating the efficiency of the use of
54 automated equipment, however when semen was processed, centrifuged and resuspended with culture
55 medium HTF - HEPES, the TYB-TK (57.35 ± 2.50) showed better SMI compared to other protocols
56 ($p < 0.0001$) TYB-GEL (33.68 ± 5.44) and Andromed-TK (23.67 ± 4.44), but no statistical difference
57 ($p = 0.571$) related to acrosome integrity, demonstrating that in some methods semen motility and
58 vigor can be reduced when processed with cell culture medium prior to insemination.

59

60 **Introdução**

61 A jaguatirica (*Leopardus pardalis* Linnaeus 1758) é um felídeo de porte médio que ocorre
62 naturalmente desde o sul dos Estados Unidos até o sul do Brasil, Uruguai e nordeste da Argentina.
63 Está classificada, quanto ao grau de ameaça, como pouco preocupante pela lista IUCN (2012), mas
64 suas subpopulações podem estar criticamente ameaçadas e diminuindo, como as subespécies
65 encontradas no sul do Texas e norte do México (*L. p. albescens*) e sul do Brasil (*L. p. mitis*), que estão
66 entre as mais ameaçadas e tanto as populações *in situ* como *ex situ* enfrentam desafios semelhantes a
67 sua sobrevivência, associados à pequena população e ao fluxo gênico restrito (STOOPS et al., 2007).

68 A inseminação artificial (IA) em felídeos é uma técnica importante para aumentar a
69 contribuição de indivíduos geneticamente valiosos em populações específicas, quer sejam felídeos
70 domésticos de raça pura, felídeos importantes de laboratório ou felídeos não domésticos ameaçados
71 de extinção (TSUTSUI, 2006).

72 A reprodução assistida com sêmen criopreservado pode ser melhor planejada, uma vez que
73 elimina a necessidade de sincronização de procedimento de coleta de sêmen e IA. Outra vantagem da
74 inseminação com sêmen congelado é a facilidade de intercâmbio de material genético entre
75 instituições, o que é fundamental para a conservação *ex situ* (MICHELETTI et al., 2011). Preservar
76 espermatozoides significa aumentar a sua longevidade, geralmente por redução da sua atividade
77 metabólica através de um processo de refrigeração e congelação controlada. No entanto, os choques
78 de temperatura são um estresse severo para os espermatozoides, frequentemente gerando crio-lesões

79 e assim destruindo a integridade funcional e estrutural das células e causando baixas taxas de
80 sobrevivência espermática (FICKEL et al., 2007, ZAMBELLI et al. 2010).

81 De acordo com Swanson (2012), a inseminação artificial já foi reportada com sucesso em
82 nove espécies de felídeos, mas ainda com baixas taxas de nascimento de filhotes, necessitando do
83 aprimoramento das técnicas descritas.

84 Pesquisadores que obtiveram sucesso em inseminação artificial de felídeos reportaram dois
85 procedimentos para preparo do sêmen após descongelamento e antes da inseminação artificial: (1)
86 Centrifugação do sêmen a 300-1200 G por 5 a 10 minutos e retirada do sobrenadante reduzindo o
87 volume da amostra para 50-100 µl, sem meio de cultivo (TOYONAGA et al., 2011; BARAN et al,
88 2011; VILLAVERDE et al., 2009) e (2) Diluição do sêmen em meio de cultivo, centrifugação do
89 sêmen de 200-600 G por 10 minutos, retirada do sobrenadante e ressuspensão do *pellet* com meio de
90 cultivo (CONFORTI et al., 2013; SWANSON et al., 1996), ambos os procedimentos com finalidade
91 de remover o criodilúente do meio. Neste trabalho os dois procedimentos de preparo de sêmen foram
92 realizados, em todas as amostras descongeladas para análise.

93 A proposta desta investigação foi testar dois diluentes comerciais, de fácil manipulação e
94 disponíveis no Brasil, para criopreservação de sêmen em *Leopardus pardalis*. Além disso, teve
95 também como objetivo testar o uso de um equipamento de criopreservação de sêmen com uma curva
96 programada, comparando-o a um método que usa vapor de nitrogênio em caixa de isopor, descrito
97 por outros pesquisadores que obtiveram sucesso na criopreservação de sêmen de felídeos, utilizando
98 material transportável e de fácil manipulação para possível uso em trabalhos de campo.

99

100 **Material e métodos**

101 1 - Aprovação

102 Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética e Uso Animal (CEUA) do Setor Palotina da
103 UFPR, sob o número 26/2010 e também pelo Ministério do Meio Ambiente, com autorização SISBIO
104 n°38908-1.

105

106 2 - Animais e coleta seminal

107 Foram utilizados quatro machos adultos de *Leopardus pardalis*, mantidos em cativeiro,
108 provenientes da natureza (n=2) e nascidos em cativeiro (n=2), todos alojados no Criadouro de
109 Animais Silvestres da Itaipu Binacional (CASIB), localizado em Foz do Iguaçu – PR. Os animais
110 receberam dieta controlada, em local onde não era permitido acesso público para visitação. Os
111 machos foram submetidos à colheita de sêmen por eletroejaculação em cinco ocasiões entre os meses
112 de fevereiro a julho, com intervalo mínimo de 30 dias. O protocolo anestésico utilizado foi baseado
113 no descrito por Juvenal et al. (2008) para *Leopardus tigrinus*, composto de uma associação de 7 mg/kg
114 de cloridrato de tiletamina + zolazepam e 1 mg/kg de cloridrato de xilazina. Após a anestesia, todos
115 os animais foram submetidos à avaliação clínica, do estado nutricional e exame andrológico externo.
116 O sêmen foi obtido utilizando um eletroejaculador específico para animais selvagens (PT
117 Electronics®, modelo 303, Boring-OR. EUA). O transdutor usado possuía comprimento de 17,6 cm
118 e diâmetro de 1,7 cm com comprimento dos três eletrodos de 3,1 cm e distância entre os eletrodos de
119 0,8 cm. O protocolo de eletroejaculação utilizado foi o proposto por Howard (1993) e consistiu em
120 um total de 80 estímulos elétricos de 2 a 5 V aplicados em três séries (30, 30 e 20 estímulos). Os
121 frascos coletados permaneciam em plataformas suporte de isopor em temperatura ambiente
122 controlada de 20°C, até a avaliação e processamento.

123 Ao final da coleta, as alíquotas obtidas com presença de espermatozoides móveis eram
124 combinadas. A análise do sêmen realizada no local avaliou: volume (com auxílio de uma
125 micropipeta), motilidade (0-100%) e vigor espermáticos (0-5), onde foi calculado o IME (HOWARD
126 et al. 1986) com a fórmula: $IME = [Motilidade (\%) + (vigor espermático \times 20)]/2$ para cada alíquota.
127 Para isso foi utilizado um microscópio ótico com aumento de 100X, equipado com placa aquecedora
128 e aferição do pH com fita (Merck®, Darmstadt, Alemanha). A concentração foi avaliada pela
129 contagem de células em câmara hematómica de *Neubauer*, após uma alíquota de 5µl de sêmen ser
130 adicionada a 200µl de solução de formol-citrato, levando-se em consideração a diluição realizada.

131 Foi realizado um esfregaço e corado com uma solução de rosa bengala, *fast-green* e citrato de sódio,
132 conforme Pope (1991), para análise morfológica dos espermatozoides e de integridade acrossomal.
133 Foi considerado íntegro o acrossoma corado em azul-arroxeadado, e lesado quando a região acrossomal
134 apresentava-se rosa ou com apenas alguns pontos azul-arroxeadados, sendo contadas 200 células em
135 cada amostra.

136
137 3 - Processamento do sêmen, teste de diluentes e curvas de congelação.

138 Somente foram processadas para o teste de criopreservação em um ou mais protocolos, as
139 amostras que atingiram o número mínimo de 20×10^6 espermatozoides móveis/ejaculado e um mínimo
140 de 50% de motilidade progressiva no ejaculado *in natura*.

141 Após a retirada das alíquotas destinadas à análise, o sêmen foi processado por três métodos,
142 conforme o número de células viáveis disponíveis. O sêmen foi diluído em meio *Modified HTF*
143 *Medium with Gentamicin – Hepes* (Irvine Scientific, Santa Ana, Ca, EUA) (HTF-Hepes) na
144 proporção de 1:1, dividido em micro tubos plásticos (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) e
145 centrifugado a 300G por 10 minutos, quando então foi retirado o sobrenadante para remoção do
146 plasma seminal. Os *pellets* residuais eram então ressuspensos utilizando os dois diluentes comerciais
147 com composição descritos na Tabela 1, para teste dos protocolos.

148

149

150 Tabela1- Componentes dos diluentes comerciais utilizados no experimento.

Componentes do diluente AND	Componentes do diluente TYB
Fosfolipídios	TES 176 mM
TRIS	Tris 80 mM
Ácido cítrico	Dextrose 9 mM
Açúcar	Sulfato de gentamicina 10 mg/mL
Antioxidantes	Glicerol 6% (final)
Solução tampão	Gema de ovo SPF (“ <i>specific pathogen free</i> ”)
Glicerol	inativada pelo calor 20%
Água de extrema pureza	
Coquetel de antibióticos	

151 *As quantidades de ingredientes do diluente AND não são fornecidas pelo fabricante.

152 *** AND - *AndroMed® CSS single step* (Minitub, Tiefenbach, Alemanha)

153 *** TYB - *Test Yolk Buffer®* (Irvine Scientific, Santa Ana, Ca, EUA)

154

155 Todas as doses foram envasadas com uma concentração mínima de 10×10^6
 156 espermatozoides/ml, em palhetas de 0,25ml. Foram testados três protocolos para criopreservação de
 157 sêmen:

158 a) *AND-TK - AndroMed® CSS single step* (Minitub, Tiefenbach, Alemanha) – (AND) com
 159 indicação original para bovinos. O meio extensor foi diluído em água bidestilada na proporção
 160 de 4:1, ficando com 6% de glicerol, com osmolaridade média de 289 mOsm kg^{-1} e sem gema
 161 de ovo ao ser adicionado ao *pellet*. As palhetas após o envase foram acondicionadas na
 162 máquina de congelação (*TK 3000®*, TK Equipamentos para Reprodução, Uberaba, MG,
 163 Brasil). A mesma foi programada para resfriar as palhetas de 20°C até 5°C em uma hora, em
 164 uma taxa de resfriamento de 0,25°C/min e, ao atingir esta temperatura, a coluna metálica do
 165 equipamento permanecia por mais uma hora e meia na temperatura de 5°C, para equilíbrio.
 166 Na sequência, o cilindro metálico, onde estavam alojadas as amostras, era mergulhado em 5
 167 cm de nitrogênio líquido e iniciava-se o processo de congelação programado, a uma taxa de
 168 $-20^\circ\text{C}/\text{min}$ até atingir a temperatura de -120°C , quando então as palhetas eram mergulhadas
 169 em nitrogênio líquido, completando a etapa de congelação.

- 170 b) *TYB-TK - Test Yolk Buffer*® (Irvine Scientific, Santa Ana, Ca, EUA) em duas frações:
171 *Refrigeration medium* (TYB-r) e *Freezing medium* (TYB-f), c
- 172 c) om indicação original para humanos. O *pellet* era diluído em 50% TYB-r, e 20 a 30 minutos
173 depois se adicionava 25% da fração TYB-f e em um intervalo de 10 minutos ocorria nova
174 adição de 25% da fração TYB-f, completando a alíquota, ficando com 6% de glicerol,
175 osmolaridade 280–320mOsmkg⁻¹ em sua composição. As palhetas após o envase foram
176 acondicionadas na máquina de congelação (*TK 3000*®, TK Equipamentos para Reprodução,
177 Uberaba, MG, Brasil) com a mesma programação descrita no item anterior.
- 178 d) *TYB-GEL - Test Yolk Buffer*® (Irvine Scientific, Santa Ana, Ca, EUA) conforme descrito no
179 item b. Porém, neste protocolo as palhetas após o envase foram colocadas em um pequeno
180 saco plástico e imersas na água em um frasco Becker com 300 ml de água a 20°C. Este
181 recipiente foi colocado em refrigerador a 5°C, durante três horas para resfriamento e
182 equilíbrio. Após o equilíbrio, as amostras foram transferidas para caixa de isopor (18 x 15 x
183 22 cm) em um suporte metálico e mantidas por um minuto em vapor de nitrogênio a 8,0 cm
184 da coluna líquida e mais um minuto a 3,0 cm da coluna líquida de nitrogênio, para então serem
185 mergulhadas em nitrogênio líquido, completando a etapa de congelação.

186

187 **Análises do sêmen descongelado.**

188

189 O descongelamento do sêmen foi realizado mergulhando as palhetas durante 30s em água
190 aquecida a 37°C. A seguir eram retirados 5µl da amostra para análise em microscópio ótico (100x)
191 quanto à motilidade (0 a 100%) e vigor espermático (0 a 5), conforme descrito anteriormente. A
192 alíquota restante de sêmen da palheta era diluída no meio HTF-Hepes na proporção de 1:1 em
193 microtubos plásticos (Eppendorf) e centrifugada a 300G por 10 minutos, quando então era retirado o
194 sobrenadante e ressuspenso em 200µl do mesmo meio de cultura, simulando uma dose para
195 inseminação artificial, sendo novamente avaliado em microscópio ótico (100x) quanto à motilidade

196 (0 a 100%) e vigor espermático (0 – 5), conforme descrito anteriormente. Nesta etapa também foram
197 realizados esfregaços conforme Pope (1991), para análise morfológica dos espermatozoides e
198 avaliação da integridade acrossomal, também em microscópio ótico (400x), sendo contadas 200
199 células em cada amostra. Com os dados de motilidade e vigor foi calculado o índice de motilidade
200 espermática (IME) para cada amostra de sêmen descongelado.

201

202 1 – Análise Estatística

203 Para os resultados numéricos são apresentados a média e o erro padrão da média (EPM). Para
204 verificar correlações entre alterações morfológicas espermáticas e qualidade de sêmen criopreservado
205 foi realizado o teste não paramétrico de Spearman, considerando como correlação moderada valores
206 positivos e negativos entre 0,5 e 0,69 e forte entre 0,7 e 1. Foi realizada comparação de motilidade,
207 vigor, IME e integridade acrossomal entre os protocolos e também as diferenças entre o sêmen fresco,
208 o sêmen descongelado e o sêmen após centrifugação nos diferentes protocolos. Foi realizado o teste
209 de Kolmogorov-Smirnov para verificação da normalidade dos dados e para dados que não se
210 encaixaram na distribuição normal foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e se
211 identificado diferenças aplicou-se o pós-teste de Dunn para múltiplas comparações. Para testes de
212 duas médias foi aplicado o teste não paramétrico de Mann-Whitney. O nível de confiança adotado
213 em todos os testes foi de 95% ($\alpha=0,05$).

214

215 **Resultados**

216 Das 20 coletas realizadas de sêmen em quatro machos de *L. pardalis*, resultaram 17 amostras
217 possíveis de congelamento para cada protocolo diferentes. As médias \pm erro padrão da média (EPM)
218 dos parâmetros seminais dos machos são expressos na Tabela 2.

219

220

221

222

223 Tabela 2. Parâmetros andrológicos de *L. pardalis* (n=4)

Parâmetro	Amplitude	Média ± EPM
Massa dos animais (Kg)	(9,40 – 14,40)	12,25 ± 0,28
Idade (anos)	(3,0 – 12,0)	6,75 ± 0,75 *
pH do sêmen	(6,0 – 8,0)	7,32 ± 0,11
Volume sêmen (ml)	(0,16 – 2,40)	1,27 ± 0,14
Motilidade progressiva (%)	(70 - 90)	78,75 ± 0,09 *
Vigor (0-5)	(3 – 4)	3,55 ± 0,09
Concentração (x10 ⁶ ml ⁻¹)	(65 – 433)	224,73 ± 26,91 *
Total espermatozoides por ejaculado (x10 ⁶ ml ⁻¹)	(47 – 666)	272,37 ± 40,41 *
Espermatozoides viáveis (x10 ⁶ ml ⁻¹)	(42 – 566)	212,59 ± 34,63 *
Espermatozoides normais (%)	(49 - 94)	79,15 ± 2,48
Acrossoma íntegro (%)	(94 – 100)	98 ± 0,40

224 * Parâmetros que apresentaram diferenças de médias entre os machos (p<0,05).

225

226 Ocorreu aumento do número de células viáveis, com motilidade progressiva, ao longo das
 227 coletas de sêmen nos mesmos animais, comparando as médias das primeiras coletas (174,67 x 10⁶
 228 ml⁻¹) com as últimas (262,53 x 10⁶ ml⁻¹), entretanto, este aumento não foi significativo (p=0,255).

229 Não houve diferença entre medias por machos no IME do sêmen descongelado (p=0,332) e
 230 no sêmen centrifugado e ressuspenso com HTF-Hepes (p=0,347) caracterizando que não houve
 231 interferência dos indivíduos nos testes.

232 Não houve correlação (r=-0,081 c/ p=0,571) entre o nível de alterações morfológicas do sêmen
 233 fresco e a motilidade progressiva do sêmen descongelado e processado com HTF-Hepes.

234 Houve queda no IME e motilidade progressiva no sêmen descongelado nos três protocolos
 235 avaliados (p<0,0001), ocorrendo quedas acima de 40% nos protocolos TYB-GEL e AND-TK,
 236 conforme expresso na Tabela 3.

237

238 Tabela 3– Motilidade progressiva, índice de motilidade espermática e percentual de acrossoma intacto nas amostras de
 239 sêmen em diferentes protocolos testados e nos diferentes tempos de análise.

Teste	Protocolo	Sêmen fresco	Sêmen descongelado	Sêmen descongelado centrifugado c/ Hepes	Significância estatística
Motilidade progressiva	TYB-TK	78,75 ± 1,31 ^{a 1}	55,29 ± 2,44 ^{a 2}	55,09 ± 3,22 ^{a 2}	(1,2) p<0,0001*
	AND-TK	78,75 ± 1,31 ^{a 1}	45,88 ± 4,62 ^{ab 2}	18,53 ± 3,58 ^{b 3}	(1,2,3) p<0,0001*
	TYB-GEL	78,75 ± 1,31 ^{a 1}	31,17 ± 5,20 ^{b 2}	27,35 ± 5,25 ^{b 2}	(1,2) p<0,0001*
		(a) p>0,9999*	(a,ab,b) p=0,0046*	(a,b) p<0,0001*	
Índice motilidade espermática	TYB-TK	74,84 ± 1,45 ^{a 1}	57,94 ± 2,10 ^{a 2}	57,35 ± 2,50 ^{a 2}	(1,2) p<0,0001*
	AND-TK	74,84 ± 1,46 ^{a 1}	50,59 ± 3,86 ^{ab 2}	23,67 ± 4,44 ^{b 3}	(1,2,3) p<0,0001*
	TYB-GEL	74,84 ± 1,47 ^{a 1}	36,17 ± 4,93 ^{b 2}	33,68 ± 5,44 ^{b 2}	(1,2) p<0,0001*
		(a) p>0,9999*	(a,ab,b) p=0,0041*	(a,b) p<0,0001*	
Acrossoma intacto	TYB-TK	98,00 ± 0,40 ^{a 1}	Nr	48,87 ± 1,39 ^{a 2}	(1,2) p<0,0001**
	AND-TK	98,00 ± 0,40 ^{a 1}	Nr	51,18 ± 3,31 ^{a 2}	(1,2) p<0,0001**
	TYB-GEL	98,00 ± 0,40 ^{a 1}	Nr	51,88 ± 3,84 ^{a 2}	(1,2) p<0,0001**
		(a) p>0,9999*		(a) p=0,5712*	

240 Legenda:

241 (a,b) – Letras diferentes indicam diferença estatística (p<0,05) entre diferentes protocolos listados na mesma coluna.

242 (1,2,3) – Números diferentes indicam diferença estatística (p<0,05) entre diferentes momentos, no mesmo protocolo,
 243 listados na mesma linha.

244 * - Teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn.

245 ** - Teste de Mann-Whitney.

246 nr – Não realizado.

247

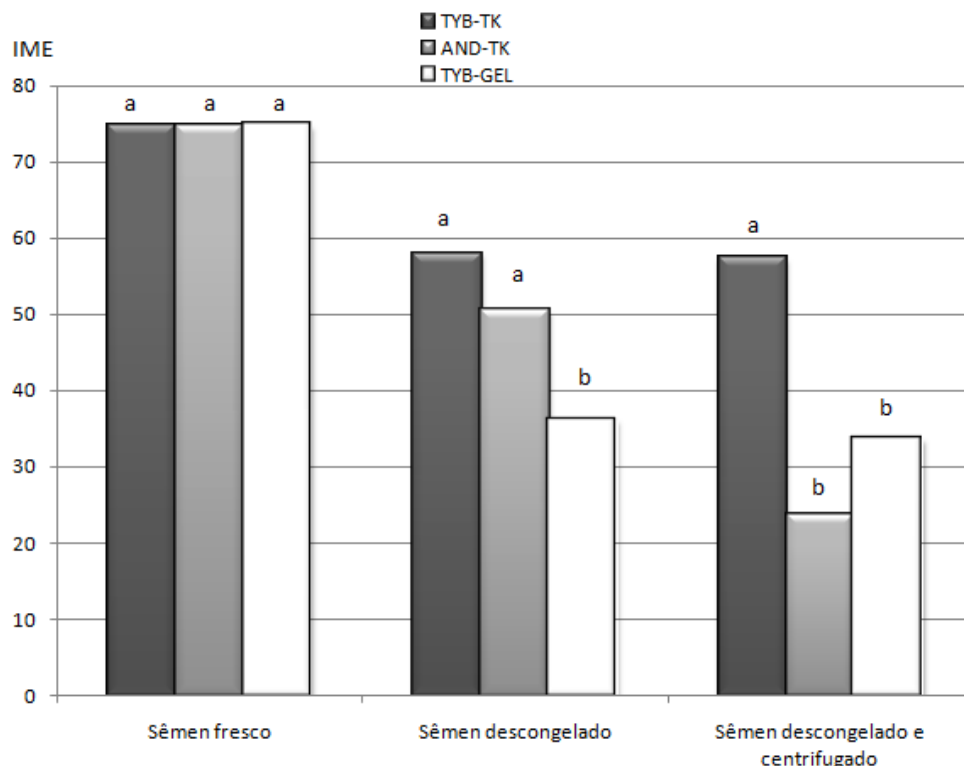
248 O protocolo TYB-TK apresentou um IME constante nos momentos descongelado (57,94 ±
 249 2,10) e centrifugado e ressuspensão com HTF-Hepes (57,35 ± 2,50), caracterizando que não sofreu
 250 interferência do processo de adição do meio, de centrifugação e ressuspensão com HTF-Hepes.

251 Já o protocolo AND-TK apresentou IME (50,59 ± 3,86) similar ao resultado encontrado no
 252 protocolo TYB-TK (57,94 ± 2,10) no momento do descongelamento (p=0,202), mas demonstrou uma

253 queda significativa ($23,67 \pm 4,44$) ($p < 0,0001$) quando foi submetido ao processo de centrifugação e
 254 ressuspensão com HTF-Hepes.

255 O protocolo TYB-GEL que apresenta o mesmo diluente do protocolo TYB-TK, mas outra
 256 curva de congelamento, não manteve os índices de motilidade espermática nos momentos de
 257 avaliação após o descongelamento ($36,17 \pm 4,93$) e submetido ao processo de centrifugação e
 258 ressuspensão com HTF-Hepes ($33,68 \pm 5,44$), quando comparado ao protocolo TYB-TK ($P < 0,001$),
 259 indicando que a curva de congelamento adotada teve impactos sobre a motilidade e vigor do sêmen.

260 Quanto à preservação da integridade acrossomal, todos os protocolos TYB-TK ($48,87 \pm 1,39$),
 261 AND-TK ($51,18 \pm 3,31$) e TYB-GEL ($51,88 \pm 3,84$), apresentaram médias equivalentes ($p = 0,571$)
 262 após a análise do protocolo de centrifugação e ressuspensão com HTF-Hepes, mas com queda
 263 próxima a 50% na integridade do acrossoma ($p < 0,0001$) em todos os protocolos, se comparados ao
 264 sêmen fresco ($98 \pm 0,40$).



265

266 Figura 1. Queda de índice de motilidade espermática (IME \pm erro padrão da média) nos diferentes protocolos testados
 267 (TYB-TK, AND-TK, TYB-GEL).

268 Legenda:

269 (a,b) – Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre diferentes protocolos testados, na mesma etapa de
 270 avaliação.

271 **Discussão**

272 Ampliar a capacidade de criopreservar espermatozoides de *L. pardalis* em condições de
273 campo complementa progressos já alcançados no desenvolvimento de reprodução assistida nesta
274 espécie e facilita o intercâmbio genético *in situ e ex situ* (STOOPS et al, 2007). A busca por
275 procedimentos padronizados e uso de diluentes comerciais foi o foco deste trabalho, para encontrar
276 curvas de congelação e diluentes que sejam efetivos para criopreservação de sêmen de *L. pardalis*.
277 Os relatos frequentes de captura de animais de vida livre para estudos ou mesmo acidentados
278 (ERDMANN et al., 2012; BARROS, 2009; MACDONALD et al. 2010; ARAUJO et al., 2013)
279 justificam o uso de métodos para criopreservação seminal, com possibilidade de uso a campo para
280 coleta e conservação do material genético.

281 Neste trabalho foram testados os diluentes: *AndroMed® CSS single step* (Minitub,
282 Tiefenbach, Alemanha), sem relato para criopreservação de sêmen de jaguatirica e o diluente *Test*
283 *Yolk Buffer®* (Irvine Scientific, Santa Ana, Ca, EUA), com relatos de uso na espécie (STOOPS et al.,
284 2007). Também se buscou testar duas curvas de congelamento para um mesmo diluente já
285 comprovado, uma curva (GEL) descrita em outros trabalhos (STOOPS et al., 2007; GAÑÁN et
286 al.,2009; CROISIER et al., 2009) e a outra (TK) como uma nova proposta executada em equipamento
287 automatizado de congelamento de sêmen, com queda de temperatura controlada e progressiva, onde
288 o tempo de congelamento é de 8 minutos diferindo da curva GEL de 4 minutos e sem um
289 monitoramento da queda da temperatura.

290 Estudos anteriores documentaram que *L. pardalis* têm excelente qualidade do esperma em
291 comparação com outros felídeos selvagens, nomeadamente nos percentuais de espermatozoides
292 apresentando morfologia normal, motilidade progressiva e membranas acrossomais intactas
293 (HOWARD, 1993; MORAES et al., 2002; BAUDI, 2005; STOOPS et al., 2007; AVILA, 2009).
294 Neste estudo estes dados se confirmaram, onde foram utilizados animais hígidos e com bom estado
295 nutricional.

296

297 Tabela 4 – Parâmetros seminais de jagatiricas encontrados em trabalhos realizados no Brasil.

<u>Autores</u> Parâmetros	Presente trabalho - 2014	Avila (2009)	Morais et al. (2002)	Baudi (2005)
Volume (ml)	1,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1	1,4 ± 0,1	0,6 ± 0,1
Espermatozoides Móveis * 10 ⁶	212,6 ± 34,6	134,0 ± 154,9	114,7 ± 15,8	201,6 ± 26,6
Espermatozoides normais %	79	65	82	78

298

299

300 Este trabalho encontrou uma quantidade média de espermatozoides viáveis e volume de sêmen
 301 em média superiores aos relatados por pesquisadores que trabalharam com *L. pardalis* no Brasil
 302 conforme Tabela 4. Stops et al. (2007) e Swanson et al. (2003) que trabalharam com *L. pardalis*
 303 encontraram um número de espermatozoides, no sêmen de *L. pardalis*, abaixo do relatado neste
 304 trabalho; 157,57 e 34,2 milhões de células por ejaculado respectivamente, com animais da América
 305 do Norte e América do Sul.

306 Em criopreservação seminal de *L. pardalis* foram descritos diluentes eficazes à base de gema
 307 de ovo, estreptomicina, lactose e 4% de glicerol (SWANSON et al., 2003; BAUDI,2005); TRIS/gema
 308 de ovo e 6% de glicerol (AVILA, 2009) e *Test Yolk Buffer*® (Irvine Scientific, Santa Ana, Ca, EUA)
 309 com 4% de glicerol (STOOPS et al., 2007). Neste trabalho foi obtido sêmen descongelado com IME
 310 médio entre 36,2 a 57,9 e preservação de integridade acrossomal entre 48,8 e 51,8%, variando
 311 conforme o protocolo adotado.

312 Jiménez et al.(2013) testaram o diluente *AndroMed*® *CSS single step* (Minitub, Tiefenbach,
 313 Alemanha) em criopreservação de sêmen colhido do epidídimo de gatos domésticos e relataram baixa
 314 efetividade deste diluente no processo de criopreservação, embora, com protocolos diferentes dos
 315 utilizados neste trabalho, onde os pesquisadores relataram a rediluição da amostra descongelada no
 316 próprio diluente ao invés do uso do HTF-Hepes usado neste trabalho.

317 Baudi (2005) obteve nos testes de congelamento de sêmen de jaguatirica um IME de 50 com
318 21,6% de integridade acrossomal e conseguiu uma taxa de 97,2% de ovócitos ligados a
319 espermatozoides descongelados. Stops et al. (2007) relataram uma taxa média de 50 a 60% de lesão
320 de membrana acrossomal no sêmen de jaguatirica criopreservado e descongelado, obtendo taxas de
321 59% de clivagem em oócitos heterólogos maduros, com este mesmo sêmen em testes de fertilização
322 *in vitro*.

323 Em jaguatiricas foram descritas curvas de criopreservação com eficácia, utilizando palhetas
324 com sêmen em geladeira e vapor de nitrogênio líquido (STOOPS et al., 2007; AVILA, 2009;
325 SWANSON et al., 1996; SWANSON, 2003); blocos de gelo seco e sêmen em *pellets* (SWANSON,
326 2003; BAUDI, 2005; STOPS et al., 2007) e palhetas com sêmen diretamente no vapor de nitrogênio
327 do próprio botijão (STOPS et al., 2007).

328 Neste experimento a curva de criopreservação utilizada no protocolo TYB-GEL é similar às
329 descritas por Gañán et al. (2009) para criopreservação de sêmen de lince (*Lynx rufus*) e por Stoops et
330 al. (2007) em testes na criopreservação de sêmen de *L. pardalis*. Esta mesma curva apresentou o IME
331 do sêmen testado inferior à curva com equipamento programável do protocolo TYB-TK ($p=0,001$)
332 no sêmen descongelado, usando o mesmo diluente. Zambeli et al. (2002) relataram que curvas de
333 resfriamento e criopreservação de sêmen, com taxas mais lentas de redução de temperatura, foram
334 mais eficientes quanto à preservação do acrossoma, motilidade e vigor no sêmen descongelado de
335 gato doméstico.

336 Os resultados encontrados neste trabalho encorajam o uso de equipamento automatizado, bem
337 como, o uso de taxas de resfriamento e congelação mais lentas, que as aplicadas com o uso de caixas
338 térmicas, para criopreservar o sêmen de *L. pardalis*, uma vez que os dois diluentes testados (TYB e
339 AND) apresentaram resultados similares no sêmen descongelado ($p=0,202$) para IME e integridade
340 acrossomal ($p=0,571$).

341 Dependendo do protocolo de manipulação do sêmen antes da inseminação artificial, pode
342 haver diferenças entre os meios. Caso o sêmen sofra centrifugação e ressuspensão em meio de cultivo,
343 o AND-TK mostrou-se inferior ao TYB-TK no IME ($p=0,004$).

344 Swanson et al. (1996) relataram o sucesso de uma IA em *L. pardalis* com sêmen descongelado,
345 realizando o protocolo de centrifugação do sêmen e ressuspensão do mesmo em meio de cultivo
346 celular Hams F10. Alguns pesquisadores realizam a avaliação do sêmen após descongelação e
347 centrifugação, quando o concentrado de espermatozoides é ressuspensado em meio de cultivo (BAUDI,
348 2005; STOOPS et al., 2007; GAÑAN et al., 2009). Gañán et al. (2009) relataram diferenças entre o
349 IME do sêmen de lince criopreservado quando expostos a diferentes meios de cultivo. O sêmen
350 descongelado em contato com o meio Hepes suplementado com soro de *Lynx rufus* não apresentou
351 qualquer perda de motilidade progressiva, enquanto que a incubação no mesmo meio com soro fetal
352 bovino demonstrou uma redução na motilidade dos espermatozoides ao longo do tempo, como
353 também foi evidenciado com o protocolo AND-TK no presente trabalho. Baran et al. (2011),
354 Toyonaga et al. (2011) e Villaverde et al. (2009) relataram o uso com sucesso de amostras de sêmen
355 para inseminação artificial em gato doméstico, centrifugadas e com remoção do sobrenadante apenas,
356 sem ressuspensão em nenhum meio diluidor. Isto poderia justificar o uso do protocolo AND-TK em
357 testes de inseminação artificial sem a ressuspensão em meio de cultivo.

358 Stoops et al. (2007) apontaram que a curva de congelamento usada na criopreservação de sêmen
359 de *L. pardalis* com o diluente TYB teve um efeito insignificante sobre o seu atributo mais crítico
360 pós-descongelamento, a função do esperma, observando índices equivalentes de clivagem fertilização
361 *in vitro* em todas as curvas testadas.

362 Análises seminais convencionais fornecem informações gerais sobre a capacidade do macho
363 para produzir normalmente e criopreservar espermatozoides móveis, mas não conseguem avaliar
364 completamente a capacidade dos espermatozoides para fertilizar um oócito, ou seja, a competência
365 funcional (GOODROWE et al. 1989). Ampliar estes testes em sêmen criopreservado e o

366 estabelecimento de protocolos de inseminação artificial devem ser considerados em novas pesquisas
367 nesta área.

368

369 **Conclusões**

370 Os resultados deste trabalho demonstraram que: (1) foi possível criopreservar sêmen de *L.*
371 *pardalis* utilizando criodiluentes comerciais desenvolvido para outras espécies; (2) o melhor
372 resultado obtido com o diluente *Test Yolk Buffer*® e associado à curva de congelação em equipamento
373 automatizado *TK 3000*® com taxas de resfriamento de -0,25°C/min e congelação de -20°C/min
374 apresentando resultados semelhantes aos obtidos em outros trabalhos; (3) O processo de
375 centrifugação e ressuspensão do sêmen descongelado com HTF-Hepes reduziu significativamente a
376 motilidade e vigor do sêmen criopreservado com o diluente *AndroMed*® *CSS single step* (Minitub,
377 Tiefenbach, Alemanha);

378 **Referências**

379 ARAUJO, G.R., PAULA, T.A.R., DECO-SOUZA T., GARAY, R.M., BERGO, L.C.F., SILVA,
380 L.C., CSERMAK JÚNIOR, A.C., FERRER, J.B.S., BARROS, J.B.G. Criptorquidismo em jaguatirica
381 de vida livre capturada no Parque Estadual do Rio Doce, Brasil *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.65,
382 n.1, p.1-5, 2013

383

384 AVILA, E.C.; **Avaliação andrológica e criopreservação de sêmen em jaguatiricas (*Leopardus***
385 ***pardalis*)**. Dissertação. Mestrado em Medicina Veterinária. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa-
386 MG; 2009.

387

388 BARAN, A.; TEK Ç.; DEMİR K; SABUNCU A, ÖZDAŞ, Ö. B. Intrauterine insemination with cat
389 semen frozen with various extenders. **Turk. J. Vet. Anim. Sci.**; v. 35 n.5 p. 311-318; 2011.

390

391 BAUDI, D. K.- Efeito de dois métodos de resfriamento sobre a função espermática *in vitro* de
392 sêmen criopreservado de felinos (*Leopardus tigrinus*, *Leopardus pardalis* e *Felis catus*), avaliada
393 através de ensaio competitivo de ligação em ovócitos de gata doméstica (*Felis catus*). Dissertação
394 de Mestrado. UFPR, 2005.

395

396 CONFORTI, V. A.; BATEMAN, H. L.; SCHOOK, M. W.; NEWSOM, J.; LYONS, L. A.; GRAHN
397 , R. A.; DEDDENS, J. A.; SWANSON, W. F. Laparoscopic oviductal artificial insemination
398 improves pregnancy success in exogenous gonadotropin-treated domestic cats as a model for
399 endangered felids. **Biol. Reprod.** 112 v.5; 89 p.1- 4, 2013

400

401 CROSIER, A.E.; HENGHALI, J.N.; HOWARD, J.G.; PUKAZHENTHI B.S.; TERRELL K.A.;
402 MARKER L.L.; WILDT D.E. Improved quality of cryopreserved cheetah (*Acinonyx jubatus*)
403 spermatozoa after centrifugation through Accudenz. **J. Androl**; v.30: p.298-308; 2009.

404

405 FICKEL, J.; WAGENER, A. & LUDWIG, A. Semen cryopreservation and the conservation of
406 endangered species. **European Journal of Wildlife Research**, v.53 n.2, p.81-89. 2007.

407

408 GAÑAN, N.; GONZÁLEZ, R.; SESTELO, A.; GARDE, J. J.; SANCHEZ, I.; AGUILAR, J. M.;&
409 ROLDAN, E. R. S. Male reproductive traits, semen cryopreservation, and heterologous in vitro
410 fertilization in the bobcat (*Lynx rufus*). **Theriogenology**, v.72 n.3, p.341-352. 2009.

411

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

415

- 416 HOWARD, J.G.; BUSH, M.; WILDT, D.E. Semen collection, analysis and cryopreservation in
417 nondomestic mammals. In: Morrow D (ed), **Current Therapy in Theriogenology II**. Philadelphia:
418 W.B. Saunders Co, p. 1047-1053, 1986.
- 419
- 420 HOWARD J.G.; WILDT D.E. Approaches and efficacy of artificial insemination in felids and
421 mustelids. **Theriogenology** v.71, p.130–148. 2009.
- 422
- 423 HOWARD, J.G. Semen collection and analysis in nondomestic carnivores. *In: Zoo and Wild Animal*
424 **Medicine III**, p. 390-399. Ed. ME Fowler. WB Saunders Co, Philadelphia, 1993.
- 425
- 426 IUCN. CASO, A., LOPEZ-GONZALEZ, C., PAYAN, E., EIZIRIK, E., DE OLIVEIRA, T., LEITE-
427 PITMAN, R., KELLY, M. & VALDERRAMA, C. 2008. *Leopardus pardalis*. In: IUCN 2012. **IUCN**
428 **Red List of Threatened Species. Version 2012**. <www.iucnredlist.org>. Acessado em 23 Mai 2013.
- 429
- 430 JIMENEZ, E; PEREZ-MARIN, C.C.; VIZUETE, G.; MILLAN, Y. AND EI AGUERA. Effect of
431 different extenders on in vitro characteristics of feline epididymal sperm during cryopreservation.
432 **Reproduction in Domestic Animals**. v.48, n. 4, p. 665–672, 2013
- 433
- 434 JUVENAL, J.C., ERDMANN, R.H., MOREIRA, N, MORAES, W., CUBAS, P.H., DELGADO, L.
435 E.S., CARVALHO, A.C., E PACHALY, J.R. Contenção farmacológica do gato-do-mato-pequeno,
436 (*Leopardus tigrinus*), para colheita de sêmen, pela associação de tiletamina zolazepam e xilazina.
437 **Pesq. Vet. Bras.** v. 28 n.11: p.541-546, 2008.
- 438
- 439 MACDONALD, D.W; LOVERIDGE AND KRISTIN NOWELL. Dramatis personae: an
440 introduction to the wild felids. In MACDONALD, D.W E LOVERIDGE, A.J. **Biology and**
441 **Conservation of Wild Felids**. Oxford University Press, 2010.

442

443 MICHELETTI,T.; CUBAS, Z.S.; MORAES, W; OLIVEIRA M.J.; KOZICKI L.E.; WEISS R.R.;
444 MOREIRA N. Reprodução assistida em felídeos selvagens – uma revisão. **Rev. Bras. Reprod.**
445 **Anim.**, Belo Horizonte, v.35, n.4, p.408-417, 2011.

446

447 MORAIS, R.N.; MUCCIOLO, R.G.; GOMES, M.L.F.; LACERDA, O.; MORAES, W.; MOREIRA,
448 N.; GRAHAM, L.H.; SWANSON, W.F.; BROWN, J.L. Seasonal analysis of sêmen characteristics,
449 serum testosterone and fecal androgens in the ocelot (*Leopardus pardalis*), margay (*L. wiedii*) and
450 tigrina (*L. tigrinus*). **Theriogenology**, p.2027-2041. 2002.

451

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

454

455 STOOPS M.A., BOND J.B., BATEMAN H.L., CAMPBELL M.K., LEVELS G.P., BROWSHER
456 T.R. Comparison of different sperm cryopreservation procedures on post-thaw quality and
457 heterologous in vitro fertilization success in the ocelot (*Leopardus pardalis*). **Reprod Fertil Dev**;
458 v.19: p.685–94. 2007.

459

460 SWANSON, WF. Laparoscopic oviductal embryo transfer and artificial insemination in felids –
461 challenges, strategies and successes. **Reprod Dom Anim**; v.47 n. 6, p.136–140 (2012).

462

463 SWANSON,W. F., HOWARD, J. G., ROTH, T. L., BROWN, J. L.,AVARADO, T., BURTON, M.,
464 STARNES, D., AND WILDT, D. E. Responsiveness of ovaries to exogenous gonadotrophins and
465 laparoscopic artificial insemination with frozen-thawed spermatozoa in ocelots (*Felis pardalis*). **J.**
466 **Reprod. Fertil.** v.106; p.87–94. 1996.

467

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

472

473 TOYONAGA, M.; SATO, Y.; SASAKI, A.; KAIHARA, A., TSUTSUI T. Artificial insemination
474 with cryopreserved sperm from feline epididymis stored at 4 °C. **Theriogenology.** v.76; p.532–537;
475 2011.

476

477 TSUTSUI T. Artificial insemination in domestic cats (*Felis catus*). **Theriogenology.** ; v.66, n.1,
478 p.122-5; 2006.

479

480 VILLAVERDE, A.I.S.B.; MELO, C.M.; MARTIN, I.; FERREIRA, T.H.; PAPA, F.O.; TACONELI,
481 C.A.; LOPES, M.D. Comparison of efficiency between two artificial insemination methods using
482 frozen-thawed semen in domestic cat (*Felis catus*). **Animal Reproduction Science.** v.114, 434-442;
483 2009.

484

485 ZAMBELLI, D.; CANEPPELE, B.; CASTAGNETTI, C. AND BELLUZZI, S. Cryopreservation of
486 cat semen in straws: Comparison of five different freezing rates. **Reprod Dom Anim.** v. 37, 310–
487 313; 2002.

488

489 ZAMBELLI, D.; IACONO, E.; RACCAGNI, R.; MERLO,B. Quality and fertilizing ability of
490 electroejaculated cat spermatozoa frozen with or without Equex STM Paste. **Theriogenology.** v. 73,
491 886–892; 2010.

492

ARTIGO 3 - Avaliação de diluentes comerciais para criopreservação de sêmen de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus* Schreber, 1775).

ARTICLE 3 - Evaluation of commercial diluents for semen cryopreservation in tigrina (*Leopardus tigrinus* Schreber, 1775).

Formatado nas normas da revista:

Archives of Veterinary Science

ISSN: 1517-784X

Avaliação de diluentes comerciais para criopreservação de sêmen de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus* Schreber, 1775)

Evaluation of commercial diluents for semen cryopreservation in tigrina (*Leopardus tigrinus* Schreber, 1775).

Resumo

A congelação de sêmen tem sido cada vez mais utilizada na criação de bancos de recursos genéticos de espécies ameaçadas de extinção. O teste da eficácia de diluentes comerciais disponíveis no país e o uso de alternativas tecnológicas no processo de criopreservação de sêmen de *Leopardus tigrinus* foram o objetivo deste trabalho. *L. tigrinus* cativos (n=13) foram anestesiados e submetidos a coletas de sêmen (n=47), com três a quatro repetições em cada indivíduo. As amostras foram avaliadas e aquelas que possuíam no mínimo 20×10^6 espermatozoides com motilidade progressiva foram testados com protocolos para criopreservação com três diluentes comerciais: **1)** (BIOX) *Bioxcell*®, **2)** (AND) *AndroMed*® CSS *single step* e **3)** (TYB) *Test Yolk Buffer* ® e com duas curvas de criopreservação: **a)** curva TK de congelação em equipamento automatizado *TK 3000*® com taxas de resfriamento de $-0,25^\circ\text{C}/\text{min}$ e congelação de $-20^\circ\text{C}/\text{min}$ e **b)** curva GEL com resfriamento e estabilização em geladeira de 20 a 5°C em duas horas e congelação em caixa de isopor em 4 minutos em plataformas de 8 cm e 3 cm acima do nível do nitrogênio líquido. As amostras de sêmen apresentaram em média (\pm erro padrão da média) volume de $0,12 \pm 0,01$ ml, com $64,76 \pm 13,96 \times 10^6$ espermatozoides vivos, com $82,78 \pm 0,72\%$ de motilidade progressiva e vigor de $3,91 \pm 0,05$. O índice de patologias espermáticas encontrado foi de $33,63 \pm 2,98\%$. Os índices de motilidade espermática

(IME) após criopreservação apontaram resultados favoráveis ($p=0,017$) para a curva TK ($45,40 \pm 3,30$) em relação à curva GEL ($32,66 \pm 4,04$), entretanto, sem diferença ($p=0,605$) quanto à integridade acrossômica. Nos protocolos associados de curvas e diluentes, foram identificadas diferenças entre os métodos testadas ($p=0,005$), com melhores médias de IME para os protocolos TYB-TK ($51,11 \pm 4,33$), AND-TK ($48,75 \pm 4,48$) e TYB-GEL ($37,50 \pm 4,62$), também sem diferença ($p>0,05$) na integridade acrossômica pós-descongelamento. Os resultados revelaram que é possível criopreservar sêmen de *Leopardus tigrinus* a partir de diluentes comerciais, sendo os melhores resultados obtidos com os diluentes *Test Yolk Buffer®* e *AndroMed® CSS single step* associado à congelação em equipamento automatizado *TK 3000®* e que houve diferenças individuais dos machos nos resultados de criopreservação seminal.

Abstract

Frozen semen has been used in genomic resource banking of endangered species. Testing the efficiency of protocols, commercial extenders available in the country and the use of alternative technologies in the cryopreservation of semen from felids were the objectives of this work. *Leopardus tigrinus* ($n=13$) were anesthetized and subjected to monthly collections of semen ($n=47$), with three to four replications in each individual. Samples were evaluated and those with at least 20×10^6 spermatozoa with progressive motility were tested for cryopreservation protocols with three commercial diluents: 1) (BIOX) Bioxcell® (IMV Technologies, L' Aigle, France), 2) (AND) Andromed ® CSS single step (Minitub, Tiefenbach , Germany) and 3) (TYB) Test Yolk Buffer ® (Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA) and two cryopreservation curves: a) TK freezing curve in automated equipment TK 3000 ® with cooling rates of -0.25 °C/min and freezing at -20 °C/min and b) GEL curve with cooling and stabilization

refrigerator 20 to 5°C in two hours and frost in polystyrene boxes in 4 minutes in 8cm and 3cm above the liquid nitrogen level platform. Semen samples showed in average (\pm standard error of the mean) volume of 0.12 ± 0.01 ml, $64.76 \pm 13.96 \times 10^6$ life sperm, with $82.78 \pm 0.72\%$ progressive motility and mean force of 3.91 ± 0.05 . The rate of sperm pathologies was found to be $33.63 \pm 2.98 \%$. The sperm motility index (SMI) after cryopreservation showed favorable results ($p=0.017$) for TK (45.40 ± 3.30) compared to GEL curve (32.66 ± 4.04), however, no difference ($p=0.605$) as the acrosome integrity. In the protocols associated curves and extenders, differences were identified among the methods ($p=0.005$), with best SMI averages for the protocols TYB-TK (51.11 ± 4.33), AND-TK (48.75 ± 4.48) and TYB-GEL (37.50 ± 4.62), also with no difference ($p>0.05$) in the acrosome integrity after thawing. The results showed that it is possible to cryopreserve semen from tigrina from commercial extenders, the best results being obtained with diluents Test Yolk Buffer® and Andromed® CSS single step associated with freezing automated equipment TK 3000® and that there were individual differences in the male semen cryopreservation results.

Introdução

Muitas das espécies de felídeos do mundo tendem a enfrentar as crescentes ameaças a sua sobrevivência na natureza. Para algumas espécies, as populações cativas podem ser utilizadas como um banco de reserva para futuro aumento populacional ou manejo genético. Como as populações da maioria dos zoológicos são originadas a partir de poucos animais, estão sujeitas à perda de variabilidade genética ao longo do tempo, com isso a infusão contínua de diferentes alelos é necessária para evitar as consequências deletérias da endogamia (SWANSON *et al.*, 2007). Essa

inclusão pode ser feita pelo intercâmbio de animais vivos ou pela utilização de técnicas de reprodução assistida, como a inseminação artificial.

Coleta e congelamento de sêmen de felídeos não domésticos de vida livre oferecem uma opção viável para a introdução de genes em populações cativas, sem a remoção de animais da natureza (SWANSON *et al.*, 2007). A aplicação dessas técnicas de reprodução assistida visa principalmente os programas *in situ* e *ex situ* de conservação das espécies de felídeos ameaçadas de extinção, com a finalidade de se obter mais filhotes de pais selecionados, assim, garantindo a variabilidade genética (VILLAVERDE E LOPES, 2007).

Swanson *et al.* (2003) consideraram que a maioria das coletas de sêmen de felídeos sul-americanos, de uma amostra de 185 machos, não atingiu o padrão mínimo para criopreservação, demonstrando assim as dificuldades de testes com grande número amostral nessas espécies.

Atualmente, existem várias descrições de protocolos de congelamento de sêmen de gato doméstico (AXNÉR E LINDE-FORSBERG 2002, ZAMBELLI *et al.* 2002, LUVONI *et al.* 2003, BAUDI *et al.* 2008; VICK *et al.* 2012, JIMENEZ *et al.*, 2013) e de felídeos selvagens (HOWARD, 1993; SWANSON, 1996; PUKAZHENTHI *et al.*, 2006; CROSIER, 2006 e AVILA, 2009). Em *Leopardus tigrinus* foi relatado o congelamento de sêmen em poucos artigos [Swanson *et al.* 2003, (n=6); Tebet 2004, (n=4); Baudi 2005, (n=4)].

A proposta desta investigação foi testar diluentes comerciais, de fácil manipulação e disponíveis no Brasil, para criopreservação de sêmen em *L.tigrinus*. Além disso, teve também como objetivo testar o uso de um equipamento de criopreservação, com curva padronizada para facilitar a formação de banco de reserva genômica, com material transportável e de fácil manipulação. Sabe-se que a maioria

dos zoológicos do Brasil possui pouca estrutura de apoio a programas de reprodução, havendo necessidade de deslocamento de materiais e infraestrutura para vários locais onde são mantidos felídeos.

Material e métodos

1 - Aprovação

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética e Uso Animal (CEUA) do Setor Palotina da UFPR, sob número 26/2010 e também pelo Ministério do Meio Ambiente, com autorização SISBIO nº38908-1.

2 - Animais e coleta seminal

Foram utilizados 13 machos adultos de *Leopardus tigrinus* (Schreber, 1775), mantidos em cativeiro, todos alojados no Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional (CASIB), localizado em Foz do Iguaçu – PR. Os animais receberam dieta controlada, em local onde não era permitido acesso público para visitação. Os machos foram submetidos à colheita de s men por eletroejacula o em três a quatro ocasiões, com intervalo mínimo de 30 dias entre cada colheita. O protocolo anestésico utilizado foi o mesmo descrito por Juvenal *et al.* (2008), composto de uma associa o de 6mg/kg de cloridrato de tiletamina + zolazepam e 0,9mg/kg de cloridrato de xilazina. Após a anestesia, todos os animais foram submetidos à avalia o clínica e exame andrológico externo. O sémen foi obtido utilizando um eletroejaculador específico para animais selvagens (PT Electronics®, modelo 303, EUA). O transdutor usado possuía comprimento de 12,6 cm e diâmetro de 1,0 cm com comprimento dos três eletrodos de 2,1 cm e distância entre os eletrodos de 0,7 cm. O protocolo de eletroejacula o utilizado foi o proposto por HOWARD (1993) e consistiu em um total de 80 estímulos

elétricos de 2 a 5 V aplicados em três séries (30, 30 e 20 estímulos). Os frascos coletados permaneciam em plataformas suporte de isopor em temperatura ambiente controlada de 20°C, até a avaliação e processamento.

Ao final da coleta, as alíquotas obtidas com presença de espermatozoides móveis eram combinadas. A análise do sêmen realizada no local avaliou: volume (com auxílio de uma micropipeta), motilidade (0-100%) e vigor espermáticos (0-5) onde foi calculado o IME com a fórmula: $IME = [Motilidade (\%) + (vigor\ espermático \times 20)]/2$ para cada alíquota. Para isso foi utilizado um microscópio ótico com aumento de 100X, equipado com placa aquecedora e aferição do pH com fita (Merck®, Darmstadt, Alemanha). A concentração foi avaliada pela contagem de células em câmara hematómica de *Neubauer*, após uma alíquota de 5µl de sêmen ser adicionada a 200µl de solução de formol-citrato, levando-se em consideração a diluição realizada. Foi realizado um esfregaço e corado com uma solução de rosa bengala, *fast-green* e citrato de sódio conforme Pope (1991), para análise morfológica dos espermatozoides e de integridade acrossomal. Foi considerado íntegro o acrossoma corado em azul-arroxado, e lesado quando a região acrossomal apresentava-se rosa ou com apenas alguns pontos azul-arroxados, sendo contadas 200 células em cada amostra.

3 - Processamento do sêmen, teste de diluentes e curvas de congelamento.

Somente foram processadas para o teste de criopreservação em um ou mais protocolos, as amostras que atingiram o número mínimo de 20×10^6 espermatozoides móveis/ejaculado e um mínimo de 60% de motilidade progressiva no ejaculado *in natura*.

Após a retirada das alíquotas destinadas à análise, o sêmen residual era processado por um, dois ou três métodos, conforme o número de células viáveis

disponíveis e doses obtidas. O sêmen era diluído em meio *Modified HTF Medium with Gentamicin – Hepes* (Irvine Scientific, Santa Ana, Ca, EUA) (HTF-Hepes) na proporção de 1:1, dividido em micro tubos plásticos (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) e centrifugado a 300G por 10 minutos, quando então era retirado o sobrenadante para remoção do plasma seminal. Os *pellets* residuais eram então diluídos com os criopreservantes, conforme indicação dos fabricantes para testes dos produtos e curvas de congelação.

Todas as doses foram envasadas com uma quantidade mínima de espermatozoides de 10×10^6 , para cada dose congelada em palhetas de 0,25ml. Foram testados três diluentes comerciais para sêmen, desenvolvidos para uso em outras espécies como crioprotetores:

3.1- *Bioxcell®* (IMV Technologies, L'Aigle, França) – (BIOX) com indicação original para bovinos. O meio extensor foi diluído em água bidestilada na proporção de 4:1, ficando com 7,5% de glicerol e sem gema de ovo ao ser adicionado ao *pellet*.

3.2- *AndroMed® CSS single step* (Minitub, Tiefenbach, Alemanha) – (AND) com indicação original para bovinos. O meio extensor foi diluído em água bidestilada na proporção de 4:1, ficando com 6% de glicerol e sem gema de ovo ao ser adicionado ao *pellet*.

3.3- *Test Yolk Buffer®* (Irvine Scientific, Santa Ana, Ca, EUA) (TYB) em duas frações: *Refrigeration medium* (TYB-r) e *Freezing medium* (TYB-f), com indicação original para humanos. O *pellet* foi diluído em 50% TYB-r, posteriormente foi adicionado à alíquota 25% da fração TYB-f e em um intervalo de 10 minutos sofreu nova adição de 25% da fração TYB-f, completando a alíquota, ficando com 6% de glicerol e com gema de ovo em sua composição.

Também foram testadas duas curvas de refrigeração e criopreservação de sêmen:

- a) Curva TK (TK) – Utilizando máquina de congelação (TK 3000®, TK Equipamentos para Reprodução, Uberaba, MG, Brasil). As palhetas após o envase foram acondicionadas no equipamento. O mesmo foi programado na curva de caprinos, para resfriar as palhetas de 20°C até 5°C em uma hora, em uma taxa de resfriamento de 0,25°C/min e ao atingir esta temperatura, a coluna metálica do equipamento permanecia por mais uma hora e meia na temperatura de 5°C, para equilíbrio. Na sequência, o cilindro metálico, onde estavam alojadas as amostras, foi mergulhado em 5 cm de nitrogênio líquido e iniciava-se o processo de congelamento programado no equipamento, a uma taxa de -20°C/min até atingir a temperatura de -120°C, quando então as palhetas foram retiradas do cilindro metálico e mergulhadas em nitrogênio líquido, completando a etapa de congelamento.
- b) Curva Geladeira (GEL): As palhetas após o envase foram colocadas em um pequeno saco plástico, para serem imersas na água em um frasco Becker com 300 ml de água a 20°C. Este recipiente foi colocado em refrigerador a 5°C, durante três horas para resfriamento e equilíbrio. Após o equilíbrio, as amostras foram transferidas para caixa de isopor (18 x 15 x 22 cm) em um suporte metálico e mantidas por um minuto em vapor de nitrogênio a 8,3 cm da coluna líquida e mais um minuto a 3,0 cm da coluna líquida de nitrogênio, para então serem mergulhadas em nitrogênio líquido, completando a etapa de congelamento.

4 – Avaliação do sêmen descongelado

O descongelamento do sêmen foi realizado mergulhando as palhetas durante 30 s em água aquecida a 37°C. A seguir, as amostras foram analisadas em

microscópio ótico (100X) quanto à motilidade (0 a 100%) e vigor espermático (0 a 5), conforme descrito anteriormente. Com os dados de motilidade e vigor foi calculado o IME para cada amostra de sêmen descongelado. Também foram realizados esfregaços conforme Pope (1991), para análise morfológica dos espermatozoides e avaliação da integridade acrossomal, também em microscópio ótico (400x), sendo contadas 200 células em cada amostra.

5 – Análise Estatística

Para os resultados numéricos e medidas de dispersão são apresentados a média e o erro padrão da média. Para verificar correlações entre alterações morfológicas espermáticas e qualidade de sêmen criopreservado foi realizado o teste de correlação de Spearman, considerando como correlação moderada valores positivos e negativos entre 0,5 e 0,69 e forte entre 0,7 e 1, sendo calculado o $\alpha=0,05$ e $\alpha=0,10$. Foi realizada comparação de motilidade, vigor, IME e integridade acrossomal entre os protocolos e também as diferenças entre o sêmen fresco, o sêmen descongelado. Foi realizado o teste de *Kolmogorov-Smirnov* para verificação se os dados apresentavam distribuição normal e aplicado o teste One-way ANOVA com pós-teste de Tukey e para dados que não se encaixaram na distribuição normal foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn para múltiplas comparações. Para testes de duas médias foi aplicado o teste não paramétrico de Mann-Whitney. O nível de confiança adotado em todos os testes de média foi de 95% ($\alpha=0,05$). Os dados foram analisados com o software InStat-3 (GraphPad Software Inc, EUA).

Resultados

Neste trabalho foram realizadas 47 coletas de sêmen, com possibilidade de congelamento em 27(57%) dos procedimentos, gerando 60 amostras congeladas com os diferentes protocolos.

O sêmen fresco coletado dos animais apresentou em cada coleta como média (\pm erro padrão da média) volume de $0,12 \pm 0,01$ ml, total de $64,76 \pm 13,96 \times 10^6$ espermatozoides móveis, com $82,78 \pm 0,72\%$ de motilidade progressiva e vigor médio de $3,91 \pm 0,05$. O índice encontrado de alterações morfológicas espermáticas foi de $33,63 \pm 2,98\%$.

As médias de IME nas curvas de congelação TK ($45,40 \pm 3,30$) e GEL ($32,66 \pm 4,04$), quando analisadas individualmente apresentaram resultados diferentes ($p=0,017$), independente do diluente utilizado.

As lesões de acrossoma identificadas pela coloração de Pope apresentaram médias similares entre todos os métodos ($p=0,605$) de curvas de congelamento e diluentes utilizados (Tabela 1).

Quando foram avaliados os protocolos utilizados de curvas e diluentes, foram identificadas diferenças entre os métodos testados ($p<0,05$) (Tabela 1), com melhores médias de motilidade para os protocolos TYB-TK e AND-TK, entretanto, apenas o protocolo BIOX-GEL diferiu destes ($p=0,004$).

Tabela 1 – Resultado de curvas e diluentes testados em criopreservação seminal de *Leopardus tigrinus* (n=13 animais; n=47 amostras).

Parâmetro / Diluente-Curva	TYB – TK ¹	TYB – GEL ²	AND – TK ³	BIOX - TK ⁴	BIOX – GEL ⁵	Valor de p
Motilidade (%) sêmen fresco	$82,78 \pm 0,72$					
Motilidade (%) sêmen descong.	$50,07 \pm 5,39^a$	$27,11 \pm 5,36^{ab}$	$43,33 \pm 4,66^a$	$24,80 \pm 7,44^{ab}$	$16,14 \pm 10,55^b$	0,004
Vigor(0-5) sêmen fresco	$3,91 \pm 0,05$					

Vigor (0-5) sêmen descong	2,61 ± 0,20 ^a	2,29 ± 0,23 ^a	2,70 ± 0,24 ^a	2,10 ± 0,27 ^a	1,29 ± 0,47 ^a	0,115
IME* sêmen fresco	80,27 ± 0,75					
IME* sêmen descong.	51,11 ± 4,33 ^a	37,50 ± 4,62 ^{ab}	48,75 ± 4,48 ^a	34,40 ± 6,24 ^{ab}	20,93 ± 9,76 ^b	0,005
Acrossoma íntegro s. fresco	97,46 ± 0,85					
Acrossoma íntegro. s. descong	53,92 ± 3,94 ^a	46,29 ± 3,92 ^a	54,33 ± 2,72 ^a	50,0 ± 8,35 ^a	52,42 ± 9,24 ^a	0,605

Letras diferentes (a b) indicam médias diferentes na mesma linha ($p < 0,05$)

*IME = Índice de motilidade espermática

1 – Diluente *Test Yolk Buffer* @associado à curva de congelação TK.

2 - Diluente *Test Yolk Buffer* @ associado à curva de congelação GEL.

3 - Diluente *AndroMed*® associado à curva de congelação TK.

4 - Diluente *Bioxcell*@associado à curva de congelação TK.

5 - Diluente *Bioxcell*@ associada à curva de congelação GEL.

Foi avaliado o IME do sêmen descongelado entre machos ($n=7$) que tiveram pelo menos três partidas de sêmen congeladas e foi evidenciada diferença estatística entre eles ($p < 0,0001$), independente do protocolo utilizado (Tabela 2). Na proporção de acrossomas íntegros também foi evidenciada diferença ($p=0,009$) entre os machos, com melhores médias para o macho Lti 1092 e Lti 1829 respectivamente.

Tabela 2 – Comparação entre machos de *Leopardus tigrinus* que tiveram ao menos três partidas de sêmen criopreservado.

Animal	Alterações espermáticas (%) sêmen fresco.	IME sêmen fresco	IME sêmen descongelado	% acrossoma íntegro no sêmen fresco	% acrossoma íntegro no sêmen descongelado
L.ti 1092	15,17 ± 4,93 ^a	80,00 ± 5,00 ^a	64,42 ± 4,60 ^a	99,00 ± 0,33 ^a	64,43 ± 6,60 ^a
L.ti 1907	40,32 ± 14,27 ^a	80,00 ± 3,54 ^a	50,36 ± 3,86 ^{ab}	97,8 ± 2,94 ^a	48,42 ± 4,28 ^{ab}
L.ti 1820	34,54 ± 18,20 ^a	79,50 ± 5,12 ^a	47,86 ± 6,60 ^{abc}	97,8 ± 3,19 ^a	42,86 ± 6,06 ^{ab}
L.ti 2334	22,76 ± 6,28 ^a	81,50 ± 3,79 ^a	46,75 ± 3,95 ^{abc}	98,8 ± 1,78 ^a	46,75 ± 5,07 ^{ab}

L.ti 1829	26,17 ± 8,89 ^a	81,67 ± 3,82 ^a	32,10 ± 6,36 ^{bcd}	98,5 ± 0,50 ^a	58,00 ± 7,17 ^a
L.ti 1161	47,33 ± 17,62 ^a	77,50 ± 4,33 ^a	24,00 ± 7,86 ^{cd}	95,83 ± 2,23 ^a	36,75 ± 8,01 ^b
L.ti 1722	51,00 ± 12,70 ^a	81,67 ± 2,89 ^a	20,12 ± 9,74 ^{cd}	95,00 ± 3,40 ^a	43,75 ± 8,02 ^{ab}

Letras diferentes (a b c d) indicam médias diferentes na mesma coluna (p<0,05).

Não foi identificada correlação significativa entre patologia espermática e IME no sêmen fresco ($r=-0,29$ e $p=0,522$), entretanto houve uma tendência de correlação negativa entre o índice de alterações morfológicas espermática do sêmen fresco e o IME do sêmen descongelado, se considerado como $\alpha=0,10$ ($r=-0,75$ e $p=0,053$) dos indivíduos analisados.

Discussão

Os resultados das análises andrológicas apresentaram volume espermático um pouco abaixo e o número de espermatozoides móveis equivalente aos descritos por Baudi (2005) e Morais *et al.* (2002) e acima aos relatados por Swanson *et al.* (2003). A porcentagem observada de espermatozoides normais foi próxima à reportada por Morais *et al.* (2002) e Baudi (2005) e superior ao relatado por Swanson *et al.* (2003) (Tabela 3). Provavelmente isso ocorreu porque Swanson *et al.* (2003) trabalharam com felídeos provenientes de diversos zoológicos, submetidos a diferentes tipos de dieta e submetidos a distintas condições de recintos e manejo.

Tabela 3 – Parâmetros seminais de *Leopardus tigrinus* reportado por diferentes autores.

<u>Autores (ANO)</u> Parâmetros	Presente trabalho - 2014	Morais et al. (2002)	Swanson et al. (2003)	Baudi (2005)
Volume (ml)	0,1 ± 0,0	0,3 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,3 ± 0,1
Espermatozoides móveis x 10 ⁶	64,7 ± 13,9	74,2 ± 8,9	10,0 ± 3,8	56,6 ± 14,4
Espermatozoides normais (%)	66,1 ± 4,9	59,2 ± 3,5	35,6 ± 6,0	76,8 ± 0,9

Os diluentes TYB e AND associados à curva TK mostraram índices adequados nos resultados para criopreservação de sêmen de *Leopardus tigrinus*, encorajando novos experimentos e indicando a possibilidade de uso destes diluentes nas ações propostas neste trabalho. Já o diluente BIOX atingiu os piores índices de motilidade espermática para criopreservação seminal.

De acordo com Jiménez *et al.* (2013), diluentes à base de TRIS/gema de ovo, como é o caso do TYB, vêm sendo utilizados pela maioria dos pesquisadores para criopreservação de sêmen de felídeos e, embora não haja diluentes comerciais específicos para felídeos, continua haver uma necessidade de usar diluentes e técnicas mais acessíveis para este propósito. O mesmo pesquisador encontrou resultados desfavoráveis para o AND em criopreservação de sêmen de felinos domésticos, entretanto, utilizando protocolos diferentes do proposto neste trabalho. Baudi *et al.* (2008) relataram o uso com sucesso, em criopreservação de sêmen de *L. tigrinus* de diluente a base de lactose, gema de ovo e 4% de glicerol. O uso do diluente TYB é descrito: em *Felis catus* por Vick *et al.* (2012); em *L. pardalis* por Stops *et al.* (2007); em *Acinonyx jubatus* por Crosier *et al.* (2006) e *Panthera tigris altaica*, *Panthera leo* e *Acinonyx jubatus* por Loskutoff (2011).

Os protocolos TYB-TK e AND-TK apresentaram resultados favoráveis e similares, se considerados motilidade, vigor, IME e integridade acrossômica, quando comparados aos descritos por Baudi (2005; IME=49) e Tebet (2004; IME=40) na espécie, caracterizando resultados promissores no seu uso. Como parâmetro de comparação foi utilizado o índice de motilidade espermática (IME) obtido por Baudi *et al.* (2008) e Tebet (2004), o que facilita a comparação entre protocolos ou indivíduos, considerando motilidade e vigor do sêmen, pois este índice considera ambos os fatores no cálculo.

Nas curvas de congelação testadas houve uma tendência de melhores resultados para a curva TK, com diferença significativa comparada à curva GEL, que é a mais usual na criopreservação de sêmen, por utilizar materiais e equipamentos convencionais. A curva TK possui uma taxa de congelamento constante de $-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$, controlada por equipamento programável. Zambeli *et al.* (2002), também utilizando equipamento programável, testaram cinco curvas de resfriamento e criopreservação de sêmen em gato doméstico, encontrando diferenças significativas na eficiência das mesmas, sendo observados melhores resultados para motilidade espermática e menores danos acrossomais com taxa de congelamento constante, entretanto, mais lenta de $-3,85^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

Howard (1993) comentou que as membranas acrossômicas são facilmente afetadas durante o congelamento e descongelamento, portanto, a avaliação do estado acrossomal é um importante critério para determinação das habilidades crioprotetoras dos vários diluentes e métodos de congelamento. Tebet *et al.* (2006) encontraram uma discrepância na proporção de espermatozoides com defeitos de acrossoma, comparando a avaliação por microscopia eletrônica com a realizada por microscopia de luz e corante de Pope, sugerindo que a técnica do corante não pôde detectar de forma eficiente as fases iniciais do dano acrossomal. Villaverde *et al.* (2008) consideraram a coloração de Pope com capacidade diminuída para identificar problemas de gotas citoplasmáticas distais, mas com boa identificação de lesão de acrossoma em gatos domésticos.

Todos os machos produziram sêmen com IMEs e integridade acrossomal similares ($p=0,168$) e ($p=0,223$) respectivamente, mas foram identificadas diferenças entre indivíduos no resultado da criopreservação em IME ($p<0,05$) e lesão de acrossoma ($p=0,015$), caracterizando o efeito do indivíduo no resultado. Também foi

observado uma tendência, de quanto maior o índice de alteração morfológica espermática no sêmen fresco menor foi o IME no sêmen descongelado ($r = -0,75$; $p < 0,10$). Estes dados são corroborados pela descrição de Pukhazhenti *et al.* (2007) que correlacionaram os índices iniciais de lesão acrossomal e defeitos morfológicos espermáticos como os maiores responsáveis pelo decréscimo da qualidade do sêmen após o descongelamento. Ganã *et al.* (2009) reportaram diferenças entre machos na qualidade do sêmen fresco, não caracterizaram diferenças individuais no sêmen congelado, mas identificaram diferenças sazonais interferindo na qualidade do sêmen congelado em *Lynx rufus*. Baudi *et al.* (2008) não relataram diferenças entre indivíduos nos resultados da criopreservação de sêmen de *L. tigrinus*. Já Ávila (2009) encontrou diferenças entre machos nos resultados de criopreservação de sêmen de *L. pardalis*.

Swanson *et al.* (2003) reportaram 17 coletas de sêmen em *L. tigrinus* que resultaram em apenas 6 congelamentos em animais provenientes de zoológicos da América Latina, indicando a dificuldade de obtenção de amostras viáveis. A baixa qualidade de sêmen de felídeos é reportada por vários pesquisadores (SWANSON *et al.* 2003; HOWARD & WILDT, 2009; PUKAZHENTHI *et al.*, 2006) e este fato corrobora a necessidade de estudos em reprodução assistida, pois os conhecimentos ainda são limitados, principalmente em espécies selvagens. Além disso, os estudos sobre as características do sêmen de mamíferos não domésticos demonstraram diferenças consideráveis na viabilidade, função e sucesso na fertilização. Assim, é necessária uma continuidade na pesquisa para o desenvolvimento de métodos de preservação seminal em animais selvagens (FICKEL *et al.*, 2007).

Conclusões

O presente trabalho permitiu realizar uma caracterização de parâmetros seminais de *Leopardus tigrinus* e avaliar a criopreservação de sêmen desta espécie. Os resultados revelaram que: (1) é possível criopreservar sêmen de *L. tigrinus* a partir de diluentes comerciais; (2) sendo os melhores resultados obtidos com os diluentes *Test Yolk Buffer®* e *AndroMed® CSS single step* associado à congelação em equipamento automatizado *TK 3000®* com taxas de resfriamento de $-0,25^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e congelação de $-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ apresentando resultados semelhantes aos obtidos em outros felídeos; (3) O equipamento automatizado de congelação seminal apresentou os melhores resultados na motilidade e vigor do sêmen descongelado. (4) houve diferenças individuais dos machos nos resultados de criopreservação seminal.

Referências

AVILA, E.C.; **Avaliação andrológica e criopreservação de sêmen em jaguatiricas (*Leopardus pardalis*)**. Dissertação. Mestrado em Medicina Veterinária. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa-MG; 2009.

AXNÉR, E.; LINDE-FORSBERG, C. Semen collection and assessment, and artificial insemination in the cat. In: CONCANNON, P.W., ENGLAND, G., VERSTEGEM, J., LINDE-FOSBERG. **Recent advances in small animal reproduction**. International Veterinary Information Service, Ithaca, New York, EUA, 2002. Disponível em: <<http://www.ivis.org>> Acesso em: 15/04/2013.

BAUDI D.L.K., JEWGENOW K., PUKAZHENTHI B.S., SPERCOSKI K.M., SANTOS A.S., REGHELIN A.L.S., et al. Influence of cooling rate on the ability of frozen-thawed sperm to bind to heterologous zona pellucida, as assessed by competitive in vitro binding assay in the ocelot (*Leopardus pardalis*) and tigrina (*Leopardus tigrinus*). **Theriogenology**; v.69, p.204–11. 2008.

BAUDI, D. K.- **Efeito de dois métodos de resfriamento sobre a função espermática *in vitro* de sêmen criopreservado de felinos (*Leopardus tigrinus*, *Leopardus pardalis* e *Felis catus*), avaliada através de ensaio competitivo de ligação em ovócitos de gata doméstica (*Felis catus*)**. Dissertação de Mestrado. UFPR, 2005.

CROSIER, A. E., PUKAZHENTHI, B. S., HENGHALI, J. N., HOWARD, J., DICKMAN, A. J., MARKER, L., & WILDT, D. E. Cryopreservation of spermatozoa from wild-born

Namibian cheetahs (*Acinonyx jubatus*) and influence of glycerol on cryosurvival. **Cryobiology**; v. 52 n.2: p.169-181. 2006.

CURRY MR. Cryopreservation of mammalian semen. **Methods Mol. Biol.** v.368: p.303-11; 2007.

FICKEL, J., WAGENER, A., & LUDWIG, A. Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. **European Journal of Wildlife Research**, v.53 n.2, p.81-89. 2007.

GANAN, N., GONZÁLEZ, R., SESTELO, A., GARDE, J. J., SANCHEZ, I., AGUILAR, J. M., & ROLDAN, E. R. S. Male reproductive traits, semen cryopreservation, and heterologous in vitro fertilization in the bobcat (*Lynx rufus*). **Theriogenology**, v.72 n.3, p.341-352. 2009.

HOWARD J.G., WILDT D.E. Approaches and efficacy of artificial insemination in felids and mustelids. **Theriogenology** v.71, p.130–148. 2009.

HOWARD, J.G. Semen collection and analysis in nondomestic carnivores. *In: Zoo and Wild Animal Medicine III*, p. 390-399. Ed. ME Fowler. WB Saunders Co, Philadelphia, 1993.

JIMENEZ, E; PEREZ-MARIN, C.C.; VIZUETE, G.; MILLAN, Y. AND EI AGUERA. Effect of different extenders on in vitro characteristics of feline epididymal sperm during cryopreservation. **Reproduction in Domestic Animals**, V. 48 n.4, p. 665–672, 2013.

JUVENAL, J.C., ERDMANN, R.H., MOREIRA, N, MORAES, W.,CUBAS, P.H., DELGADO, L. E.S., CARVALHO, A.C., E PACHALY, J.R. Contenção farmacológica do gato-do-mato-pequeno, (*Leopardus tigrinus*), para colheita de sêmen, pela associação de tiletamina zolazepam e xilazina. **Pesq. Vet. Bras.** v.28 n.11, p.541-546, 2008.

LOSKUTOFF N.M. Large Felid Semen Cryopreservation. Resource Manual. **A compilation of standard operating procedures for embryo transfer and related technologies for CANDES (IETS)**. <http://www.iets.org/iets/2011_Resource_Manual.pdf> acessado em 25 de junho de 2013; atualizado em junho 2011.

LUVONI, G.C., KALCHSCHMIDT, E., LEONI, S., RUGGIERO, C. Review: Conservation of feline semen Part I: Cooling and freezing protocols. **Journal of Feline Medicine and Surgery** v.5, p.203–208, 2003.

MORAIS, R.N.; MUCCILOLO, R.G.; GOMES, M.L.F.; LACERDA, O.; MORAES, W.; MOREIRA, N.; GRAHAM, L.H.; SWANSON, W.F.; BROWN, J.L. Seasonal analysis of sêmen characteristics, serum testosterone and fecal androgens in the ocelot (*Leopardus pardalis*), margay (*L. wiedii*) and tigrina (*L. tigrinus*). **Theriogenology**, p.2027-2041. 2002.

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

PUKAZHENTHI B.; WILDT D.E.; HOWARD J.G.; The phenomenon and significance of teratospermia in felids. **J Reprod Fertil** v.57, p.423–33; 2001.

PUKAZHENTHI, B.; SANTYMIRE, R.; CROSIER, A., HOWARD, J.; WILDT D.E. Challenges in cryopreserving endangered mammal spermatozoa: morphology and the value of acrossomal integrity as markers of cryo-survival. **Soc Reprod Fertil Suppl.** V.65: p.433-46. 2007

PUKAZHENTHI, B; LAROE, D; CROSIER, A; BUSH, L M; SPINDLER, R; PELICAN, K M.; BUSH, M; HOWARD, J G; WILDT, D E. Challenges in cryopreservation of clouded leopard (*Neofelis nebulosa*) spermatozoa, **Theriogenology**. V.66, n. 6–7, p.1790-1796. 2006.

STOOPS, M.A., BOND, J.B., BATEMAN H.L., CAMPBELL, M.K., LEVELS, G.P., BROWNSHER, T.R., Comparison of different sperm cryopreservation procedures on post-thaw quality and heterologous in vitro fertilization success in the ocelot (*Leopardus pardalis*). **Reprod Fertil Dev**. v.19 p.685–94. 2007.

SWANSON W.F., MAGAREY G.M., HERRICK J.R. Sperm cryopreservation in endangered felids: developing linkage of in situ-ex situ populations. **Soc Reprod Fertil Suppl.** v.65: p.417-32, 2007.

TEBET, J. M. (2004) **Efeito da criopreservação sobre a célula espermática em três espécies de felinos: O gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), a jaguatirica (*Leopardus pardalis*) e o gato doméstico (*Felis catus*)**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” FMVZ. Botucatu, SP. 2004.

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

VICK, M.M.; BATEMAN, H.L.; LAMBO, C.A.; SWANSON, W.F. Improved cryopreservation of domestic cat sperm in a chemically defined medium. **Theriogenology**. v.78, p.2120-2128, 2012.

VILLAVERDE, A. I. S. B; LOPES, M. D. Inseminação artificial em gatos domésticos utilizando sêmen criopreservado. **Rev Bras Reprod Anim**. v.31, n.1, 77-83, 2007.

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

ARTIGO 4 - Validação de teste de detecção de andrógenos e corticoides fecais por enzimoimunoensaio e quimioluminescência em felídeos do gênero *Leopardus*

ARTICLE 4 - Validation test of fecal analysis of androgens and corticoids by enzymeimmunoassay and chemiluminescence in felids of the *Leopardus* genus

Formatado nas normas da revista:

Archives of Veterinary Science

ISSN: 1517-784X

Validação de teste de detecção de andrógenos e corticoides fecais por enzimoimunoensaio e quimioluminescência em felídeos do gênero *Leopardus*

Validation test of fecal analysis of androgens and corticoids by enzymeimmunoassay

Resumo

Leopardus pardalis (Lineaus 1758), *Leopardus tigrinus* (Schreber, 1775) e *Leopardus wiedii* (Schinz, 1821), apresentam populações decrescentes em vida livre, principalmente em decorrência da destruição do hábitat. A criação em cativeiro é uma das formas para a conservação destas espécies e o conhecimento da fisiologia reprodutiva é essencial para a aplicação de técnicas de reprodução assistida. A mensuração de corticoides e andrógenos fecais são métodos aceitos para o monitoramento endócrino de estresse e atividade reprodutiva, respectivamente, em machos de felídeos. Neste trabalho foi testada a capacidade de detecção de andrógenos fecais por dois kits comerciais: *Testosterone EIA-1559* (DRG International, Inc., EUA) por método enzimoimunoensaio (EIA) e *Testosterone assay 33560* (Beckman Coulter, Inc. 250 S. Kraemer Blvd. Brea, CA,EUA.) pelo método de quimioluminescência (CLIA) em machos de *L. wiedii* estimulados com análogo de GnRH (n=3) e análogo de hCG (n=2); em machos de *L. pardalis* (n=2) e *L. tigrinus* (n=1) estimulados com análogos de GnRH; e a detecção de corticoides fecais pelo kit comercial *Cortisol(EIA-1887 - DRG International, Inc., USA)* por método de enzimoimunoensaio (EIA) em machos de *L. wiedii* (n=2), de *L. pardalis* (n=2) e de *L. tigrinus* (n=2) estimulados com análogo de ACTH. Todas as amostras fecais foram processadas com um protocolo modificado de Schwarzemberger et al. (1991). *L. wiedii* estimulados com análogo de GnRH apresentaram uma resposta fisiológica com

aumento de excreção de andrógenos fecais, detectado pelos dois *kits* testados: DRG (EIA) e Beckman Coulter (CLIA) com forte correlação ($r=0,9299$ com $p<0,0001$) entre os métodos. Em diluições seriadas foi caracterizada a linearidade dos testes nos métodos CLIA ($r=0,998$ e $p<0,001$) e EIA ($r=0,989$ e $p<0,001$). Os kits DRG Testosterona EIA-1559 e DRG Cortisol EIA-1887, respectivamente, foram eficazes para identificar alterações endócrinas de andrógenos fecais e corticoides fecais em machos de *L. wiedii*, *L. pardalis* e *L. tigrinus* estimulados com GnRH e ACTH, já os estímulos pelo análogo de hCG em *L. wiedii* foram inconsistentes para caracterização da resposta endócrina. Foram identificadas variações individuais na intensidade de respostas para estímulos endócrinos com análogos de GnRH e ACTH em machos de *L. wiedii*, *L. pardalis* e *L. tigrinus*.

Abstract

Leopardus pardalis (Lineaus 1758), *Leopardus tigrinus* (Schreber, 1775) and *Leopardus wiedii* (Schinz, 1821) have decreasing wild populations, mainly due to habitat destruction. Captive breeding is performed as an alternative in the conservation of these species and knowledge of reproductive physiology and baseline physiological data are the first actions to aid in the application of assisted reproduction programs. Measurement of fecal steroids and androgens are accepted methods for monitoring stress and reproductive activity in felids. In this work the ability to detect fecal androgens was tested by two different commercial kits: Testosterone (EIA-1559 DRG International, Inc., USA) method by enzymeimmunoassay (EIA) and 33560 Testosterone assay (Beckman Coulter, Inc. S. Kraemer Blvd 250 Brea, CA 92821 USA) by chemiluminescence (CLIA) in margay cats stimulated with GnRH analog ($n=3$) and hCG analog ($n=2$), the detection of fecal androgens Testosterone

commercial kit (EIA-1559 - DRG) in *L. pardalis* (n=2) and *L. tigrinus* (n=1) stimulated with GnRH analogues and detection of fecal steroids by Cortisol commercial kit (EIA-1887 - DRG International, Inc., USA) by the method of enzymeimmunoassay (EIA) in *L. wiedii* (n=2), *L. pardalis* (n=2) and *L. tigrinus* (n = 2) stimulated with ACTH analog. All fecal samples were processed with a modified protocol (Schwarzemberger et al. 1991). *L. wiedii* stimulated with GnRH analog showed a physiological response with increased excretion of fecal androgens, detected by the two kits: DRG (EIA) and Beckman Coulter (CLIA) with a strong correlation ($r=0.9299$ and $p<0.0001$) between methodologies. In serial dilutions was characterizing the linearity testing methodologies CLIA ($r=0.998$ and $p<0.001$) and EIA ($r=0.989$ and $p<0.001$). Testosterone EIA kits DRG-1559 and DRG Cortisol EIA-1887, respectively, were effective in identifying endocrine changes of fecal androgens and fecal steroids in *L. wiedii*, *L. pardalis* and *L. tigrinus* stimulated with GnRH and ACTH, already stimulated by hCG analog in margays were inconsistent to characterization of the endocrine response. Individual variations in the intensity of response to endocrine stimulation with GnRH analogues and ACTH in *L. wiedii*, *L. pardalis* and *L. tigrinus* were identified.

Introdução

Nas florestas tropicais do Brasil, o *Leopardus pardalis* (Lineaus, 1758), o *Leopardus tigrinus* (Schreber, 1775) e o *Leopardus wiedii* (Schinz, 1821) estão entre os felídeos que lutam para sobreviver, principalmente em decorrência da destruição do hábitat. Comum a todos os felídeos, as espécies têm sofrido diminuição de extensão e qualidade de habitat, com declínio populacional (Moreira, 2001). As três espécies utilizadas neste trabalho estão classificadas pela IUCN (2012) como tendo

populações decrescentes, embora haja áreas de preservação destas espécies, existem áreas onde algumas populações regionais estão ameaçadas.

A criação destas espécies em cativeiro e aplicação de biotecnologia, para melhorar índices de sobrevivência em cativeiro e índices de eficiência reprodutiva, tem sido preocupação constante de pesquisadores. O uso de ferramentas tecnológicas para caracterização de dados basais e o conhecimento de fisiologia reprodutiva são as primeiras ações para o auxílio na aplicação de programas de reprodução assistida.

O monitoramento endócrino pela mensuração de metabólitos de hormônios esteroides em fezes e urina tem sido uma alternativa viável na investigação da fisiologia reprodutiva e do estresse em uma grande variedade de aves e mamíferos, domésticos e selvagens. Esta abordagem integra a endocrinologia com estudos comportamentais e ecológicos, com aplicações em diversas áreas tais como bem-estar animal, comportamento social, reprodução, biologia da conservação, biomedicina, entre outros (Pereira, 2007).

Mais recentemente, estudos comparativos endócrinos têm expandido a base de conhecimento dos felídeos não domésticos. Em grande parte através do desenvolvimento de técnicas de análise não invasiva por quantificação de metabólitos fecais de esteroides que atualmente é o método de escolha para a monitorização da função endócrina em espécies selvagens (Brown, 2006).

No gênero *Leopardus*, alguns trabalhos apontaram resultados de avaliações endócrinas (Moreira, 2001; Morais *et al.*, 2002; Swanson *et al.* 2003; Dias *et al.*, 2008; Genaro *et al.* ,2007; Paz *et al.*, 2009; Ribeiro-Silva, 2010), mas ainda há necessidade de melhor conhecimento de fisiologia das espécies, testes para validação de novas técnicas e do uso de *kits* comerciais, que podem facilitar o acesso a resultados, com disponibilidade facilitada.

Existem vários métodos empregados na validação da mensuração de corticoides fecais. Ensaio endócrino são usados para avaliar a elevação de metabólitos de glicocorticoides em fezes de animais depois da aplicação de ACTH ou uma variante sintética. Fezes são coletadas três dias antes e cinco a sete dias após a aplicação de ACTH. Quando um análogo de ACTH é administrado a um mamífero, ele atua sobre os precursores adrenais para causar a liberação de glicocorticoides (cortisol e corticosterona), o que causa um aumento das concentrações plasmáticas destes esteroides, seguido de um retorno a concentrações basais. Estas alterações em concentrações séricas refletem-se nos metabólitos fecais (WASSER *et al.*, 2000).

Para detecção de andrógenos fecais utiliza-se a aplicação de análogo de GnRH. Análogos de GnRH têm atividade altamente específica. Hormônios proteicos atuam em receptores de tecidos específicos, hiperestimulando receptores na pituitária anterior gerando produção e liberação de LH e FSH em mamíferos e aves e, conseqüentemente, aumentando os níveis de testosterona em machos (OTTINGER, 2002).

Para validação biológica e fisiológica de testes de detecção de corticoides fecais, as amostras são recolhidas por certo tempo, mensuradas com o teste em questão, antes e depois da injeção de ACTH exógeno, que deve resultar num aumento significativo das concentrações de glicocorticoides (TUOMA E PALME, 2005).

Neste trabalho buscou-se a validação biológica de dois testes para detecção de metabólitos de testosterona e um teste para detecção de metabólitos de cortisol, todos disponíveis comercialmente no Brasil. Verificando se os mesmos detectam alterações endócrinas sofridas pelos animais, quando estimulados com hormônios exógenos. Os valores numéricos das concentrações de metabólitos fecais podem

variar conforme a espécie, técnica de extração ou teste empregado, mas as oscilações endócrinas devem ser identificadas.

Materiais e método

1 - Aprovação

Este trabalho foi aprovado pelo Ministério do Meio Ambiente, com autorização SISBIO nº 38908-1.

2 - Animais

Foram utilizados machos de *Leopardus wiedii* (n=6), *Leopardus tigrinus* (n=3) e *Leopardus pardalis* (n=4), adultos, mantidos em cativeiro, alguns provenientes da natureza e outros nascidos em cativeiro, todos alojados individualmente no Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional (CASIB), localizado em Foz do Iguaçu – PR (25°54'45" S; 54°58'07" W), conforme descrito no quadro 1. Um macho de *Leopardus wiedii* (2409) foi utilizado em duas ocasiões para testes diferentes, sendo que houve um intervalo acima de 60 dias entre os testes, sendo identificados com a letra “a” no segundo teste (2409^a). Os felídeos receberam dieta controlada, em local onde não era permitido acesso público para visitação e estavam expostos a fotoperíodo natural, sendo que este experimento ocorreu no período de primavera e verão do hemisfério sul, entre os meses de novembro e fevereiro. Os animais do projeto foram previamente avaliados quanto à sanidade com exames clínicos, andrológicos, hematológicos e bioquímicos séricos, sendo todos considerados hígidos.

3 – Delineamento do experimento

Todos os animais tiveram amostras fecais coletadas por 11 dias, considerando que em alguns dias do experimento não ocorreu defecação por alguns animais. No sexto dia do experimento os animais foram capturados com puçá e submetidos à estimulação hormonal com produto injetável (Quadro 1).

Os produtos utilizados para estímulo hormonal foram:

- a) Synacthen[®]-Tetracosactrin (ACTH) 1mg/ml (Novartis Pharmaceuticals - Austrália).
- b) Gestran-Plus[®]- Acetato de Gonadorelina (análogo ao GnRH) 2,5 mg/100ml (ARSA S.R.L. – Buenos Aires – Argentina).
- c) Chorulon[®] - Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG) 1000 UI/ml (Intervet do Brasil Veterinária Ltda.; Cotia – SP).

Quadro 1- Animais e estímulo hormonal aplicado

Hormônio, dose e via	Espécie	Número	Origem
GnRH 0,005 mg IM	<i>L. wiedii</i>	2450	Zoológico
GnRH 0,005 mg IM	<i>L. wiedii</i>	2409a	Zoológico
GnRH 0,005 mg IM	<i>L. wiedii</i>	1495	Zoológico
GnRH 0,005 mg IM	<i>L. tigrinus</i>	2208	Natureza
GnRH 0,01 mg IM	<i>L. pardalis</i>	2323	Natureza
GnRH 0,01 mg IM	<i>L. pardalis</i>	2398	Zoológico
hCG 200 UI IM	<i>L. wiedii</i>	2452	Zoológico
hCG 200 UI IM	<i>L. wiedii</i>	1801	Zoológico
ACTH 0,125 mg IM	<i>L. wiedii</i>	2333	Natureza
ACTH 0,125 mg IM	<i>L. wiedii</i>	2409	Zoológico
ACTH 0,125 mg IM	<i>L. tigrinus</i>	1907	Natureza
ACTH 0,125 mg IM	<i>L. tigrinus</i>	2334	Zoológico
ACTH 0,250 mg IM	<i>L. pardalis</i>	1720	Zoológico
ACTH 0,250 mg IM	<i>L. pardalis</i>	2324	Natureza

As amostras fecais, após processamento, foram avaliadas para detecção de glicocorticoides e andrógenos fecais, buscando identificar resposta endócrina dos animais frente aos estímulos hormonais sofridos. Também foi realizada validação de ensaio quantitativo de metabólitos fecais de andrógenos e glicocorticóides por ensaio imunoenzimático (EIA) e ensaio quantitativo de metabólitos de andrógenos fecais por quimioluminescência (CLIA).

4 – Coleta e processamento das amostras.

As amostras fecais foram coletadas em sua totalidade do bolo fecal, acondicionadas em sacos plásticos tipo *zip lock*, identificadas com o número do animal, número do recinto e data da coleta e armazenadas em freezer a -20°C. O descongelamento ocorreu em temperatura ambiente e as amostras foram

processadas com um protocolo modificado de Schwarzenberger *et al.* (1991) similar ao descrito por Jewgenow (2006), resumidamente, para extração dos metabólitos fecais em meio alcoólico, consistiu em pesar $0,50 \pm 0,02$ g de fezes úmidas bem homogeneizadas e colocadas em tubos de ensaio identificados de acordo com o saco plástico utilizado para coleta. Adicionar 5 ml de metanol 90% (metanol PA 90; H₂O 10) a cada tubo. Os tubos contendo as soluções foram homogeneizados em um Vórtex por 15 minutos. As amostras então foram centrifugadas a 1500G durante 15 minutos. Após a centrifugação foram recuperados 2 ml do sobrenadante e acondicionados em um criotubo com tampa rosqueada, com a identificação da amostra.

As amostras foram diluídas em solução tampão PBS em várias diluições seriadas para verificação da linearidade das diluições e optou-se pela diluição 1:10 para as análises por enzimoimunoensaio (EIA) e algumas amostras que se apresentaram fora da faixa de detecção do ensaio foram diluídas 1:5 na mesma solução, para reteste. Para análise de CLIA também foram realizadas diluições seriadas em solução tampão PBS para verificação de linearidade e optou-se pela diluição 1:4. Todas as amostras foram lidas em duplicata e considerou-se a média das leituras. Quando houve discrepância nos resultados acima de 10%, as amostras foram novamente analisadas.

4.1 - Análise de andrógenos fecais

Para leitura por EIA em equipamento automatizado (Biotek ELX800, BioTek Instruments, Inc.,EUA) com faixa de leitura de 450 ± 10 nm, foram utilizadas placas comerciais para Testosterona (*Testosterone* EIA-1559, DRG®International, Inc., EUA) em fase sólida, com base no princípio da ligação competitiva com anticorpo monoclonal, apresentam reatividade cruzada com 100% Testosterona; 0,8% 5 α

Dihidrotestosterona; 0,9% Androstenediona; 3,3% 11 β Hidroxitestosterona; 0,1% 17 α Metiltestosterona; 3,3% Nortestosterona; <0,1% Epitestosterona; <0,1 Estradiol; <0,1% Progesterona; <0,1% Cortisol; <0,1% Estrona.

Amostras de metabólitos fecais de provenientes de *L. wiedii* (n=3) deste experimento foram diluídas 1:2 em tampão PBS e dosadas com ensaio por CLIA para testosterona (n=24), as mesmas amostras foram diluídas 1:10 em tampão PBS e dosadas com teste EIA para testosterona (n=24) visando quantificar metabólitos andrógenos fecais e realizar correlação entre os métodos.

Para análise por CLIA foi utilizado o *kit* Access Testosterone assay 33560 (Beckman Coulter, Inc. 250 S. Kraemer Blvd. Brea, CA 92821 EUA.) para dosagem de testosterona no extrato fecal de gatos-maracajá. O princípio do teste é um ensaio imunoenzimático de ligação competitiva, utilizando anticorpo monoclonal anti-testosterona de rato, conjugado de testosterona alcalina, partículas paramagnéticas de anticorpo policlonal anti-testosterona de rato e substrato quimioluminescente, apresentando reatividade cruzada com 100% testosterona; 0,3% sulfato de testosterona; 2% 5 α di-hidrotestosterona; 0,7% androstenediona; 6,7 cetotestosterona; 4,1 % 11 β hidroxitestosterona; 0% estradiol; <0,1% progesterona; <0,4% cortisol; <0,1% estrona.

4.2 - Análise de corticoides fecais

Para leitura por EIA em equipamento automatizado (Biotek ELX800, BioTek Instruments, Inc.,USA) com faixa de leitura de 450 \pm 10 nm, foram utilizadas placas comerciais para Cortisol (*Cortisol* EIA-1887 DRG[®] International, Inc., USA) em fase sólida, baseado no princípio da ligação competitiva com anticorpo monoclonal. Este ensaio apresenta reatividade cruzada com 100% cortisol; 45% corticosterona; <9%

progesterona; <2% desoxicortisol; <2% dexametasona; <0,01% estriol; <0,01% estrona; <0,01% testosterona.

5 - Estatística.

Foram realizadas estatísticas descritivas e medidas de dispersão, com apresentação gráfica dos resultados. Foi realizado considerado um pico hormonal quando os níveis metabólitos fecais aumentaram o equivalente à dois desvios padrões acima da media basal, sendo marcados com asteriscos (*) nos gráficos. Foi realizado o teste de *Kolmogorov-Smirnov* para verificação da normalidade dos dados e aplicado o teste t de Student para duas médias e para os dados que não se encaixaram na distribuição normal foi aplicado o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Nos dados com possibilidade de correlação, foi realizado o teste de correlação de Pearson, considerando como correlação moderada valores positivos e negativos entre 0,5 e 0,69 e forte entre 0,7 e 1. O nível de confiança adotado em todos os testes foi de 95% ($\alpha=0,05$).

Resultados e discussão

Morato *et al.* (2004) mostraram que a determinação de corticoide fecal e de metabólitos de andrógenos pode ser útil para uma avaliação não invasiva de bem-estar animal e como um complemento para estudos comportamentais, fisiológicos e patológicos. Também pode ser útil para o estudo da relação entre a atividade adrenal e o desempenho reprodutivo de felídeos.

Em geral, os hormônios esteroides circulantes são metabolizados pelo fígado e excretados como conjugados através dos rins na urina ou através da bile no intestino. Uma vez no intestino, uma parte dos esteroides sofre reabsorção e nova

circulação êntero-hepática sendo intensivamente metabolizado pela flora microbiana, mas a estrutura da molécula não é degradada. Portanto, metabólitos do esteroide podem ser detectados nas fezes de mamíferos e excretas de aves (TUOMA E PALME, 2005).

Em algumas espécies, como gato ou rato, uma elevada percentagem de metabólitos de glicocorticoides são excretados através das fezes, enquanto em outros (por exemplo, ovelha, porco, cão ou elefante) a principal via de eliminação é a urina (PALME et al., 2005). Como *Felis catus* são regularmente considerados modelos para felídeos selvagens, tem se assumido que felídeos metabolizam hormônios esteroidais pelas mesmas vias. Um procedimento de extração relativamente simples em amostras fecais (suspensão das fezes de mamíferos em 80% de metanol) provou ser mais adequado para praticamente todos os mamíferos testados até agora, sem passar por processos de evaporação (TUOMA E PALME, 2005; PALME et al., 2005).

1 - Detecção de andrógenos fecais.

A detecção média (\pm DP) de andrógenos fecais em amostras fecais (n=38) de *L. wiedii*, sem estimulação endócrina, foi de $69,08 \pm 36,54$ ng/g de fezes no período controle, em amostras fecais (n=16) de *L. pardalis* foi $254,39 \pm 227,13$ ng/g de fezes e em amostras fecais (n=14) de gatos-do-mato-pequeno de $97,67 \pm 57,06$ ng/g de fezes, considerando o teste de EIA, sendo a média de *L. wiedii* considerada inferior a de *L. pardalis* ($p < 0,001$) e similares às de *L. tigrinus* ($p > 0,05$). Entre *L. pardalis* e *L. tigrinus* também houve diferença estatística ($p < 0,01$) nas médias de andrógenos fecais.

Em *L. wiedii*, a estimulação com análogo de GnRH apresentou uma resposta fisiológica com aumento de excreção de andrógenos fecais, detectado nas métodos de CLIA-testosterona e EIA-testosterona. *L. pardalis* e *L. tigrinus* também

responderam ao estímulo com GnRH, apresentando picos de resposta na produção de andrógenos fecais detectados pelo método EIA-testosterona.

O aumento de andrógenos fecais em *L. wiedii*, com estímulo pelo análogo de hCG, foi detectado tardiamente em um animal e não detectado em outro.

Houve forte correlação ($r=0,9299$ com $p<0,0001$) entre os métodos EIA e CLIA para detecção de andrógenos fecais em *L. wiedii*, embora, as médias de valores na CLIA tenham sido em média 42,16% menores ($p=0,0066$), mas as curvas gráficas foram similares, conforme expresso nas Figuras 1, 2 e 3.

O teste para metabolitos andrógenos (EIA-1559-DRG®) apresentou coeficientes de variação (CV) intra-ensaio de 4,16% e inter-ensaio de 9,94%. O teste CLIA-Access Testosterone assay 33560 (Beckman Coulter) apresentou CV intra-ensaio de 3,93% e inter-ensaio de 7,08%.

Nas diluições seriadas de (1:2 a 1:64) de extrato fecal, para mensuração de andrógenos fecais, houve forte correlação entre os valores encontrados e diluições propostas nos métodos CLIA ($r=0,998$ e $p<0,001$) e EIA ($r=0,989$ e $p<0,001$), caracterizando a linearidade do teste nos dois ensaios.

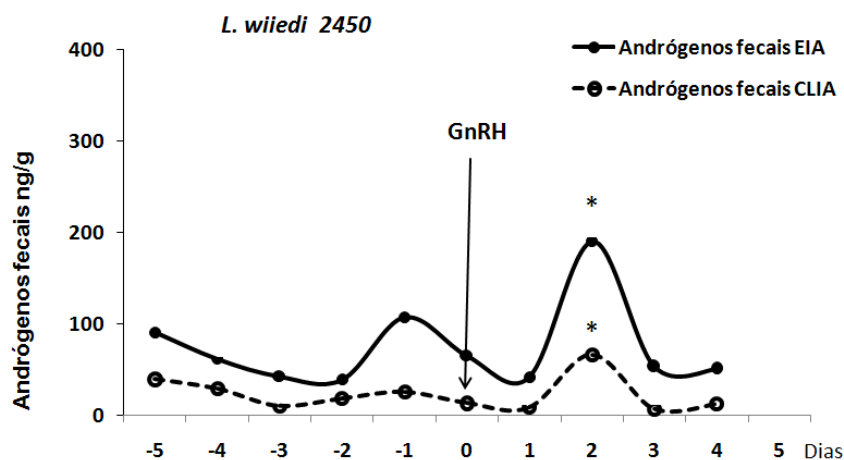


Figura 1 – Macho de *L. wiedii* estimulado com análogo de GnRH com detecção de andrógenos fecais pelos métodos de enzimoimunoensaio (EIA) e quimioluminescência (CLIA) ($r=0,914$ e $p=0,0002$).

(*) Pico hormonal.

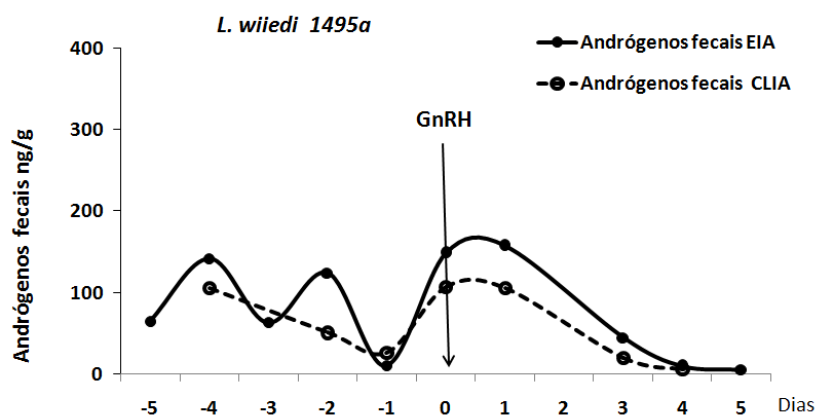


Figura 2 – *Leopardus wiedii* 1495a estimulado com análogo de GnRH com detecção de andrógenos fecais pelos métodos EIA e CLIA ($r=0,930$ e $p=0,002$).

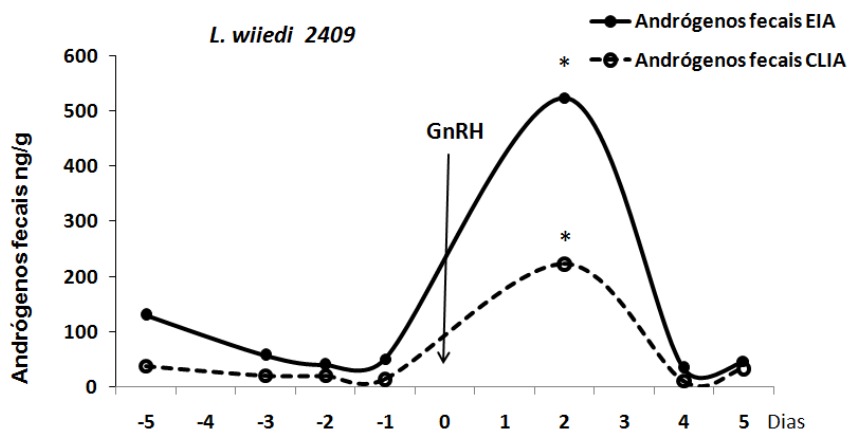


Figura 3 – *Leopardus wiedii* 2409 estimulado com análogo de GnRH com detecção de andrógenos fecais pelos métodos EIA e CLIA ($r=0,992$ e $p<0,0001$). (*) Pico hormonal.

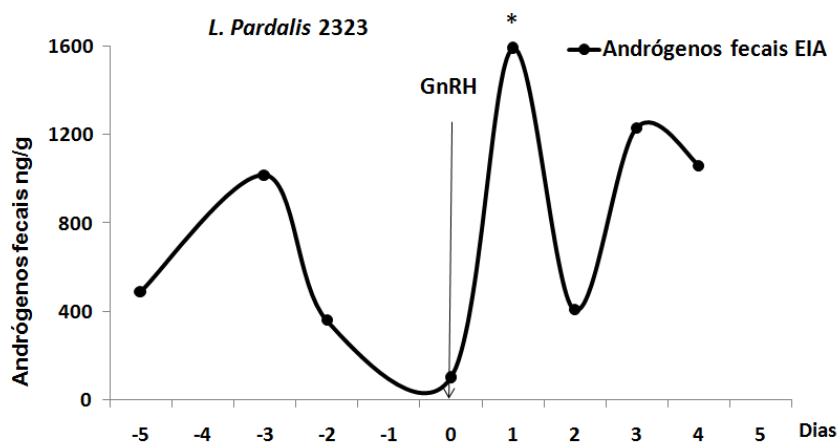


Figura 4 – *Leopardus pardalis* 2323 estimulado com análogo de GnRH com detecção de andrógenos fecais pelo método EIA. (*) Pico hormonal.

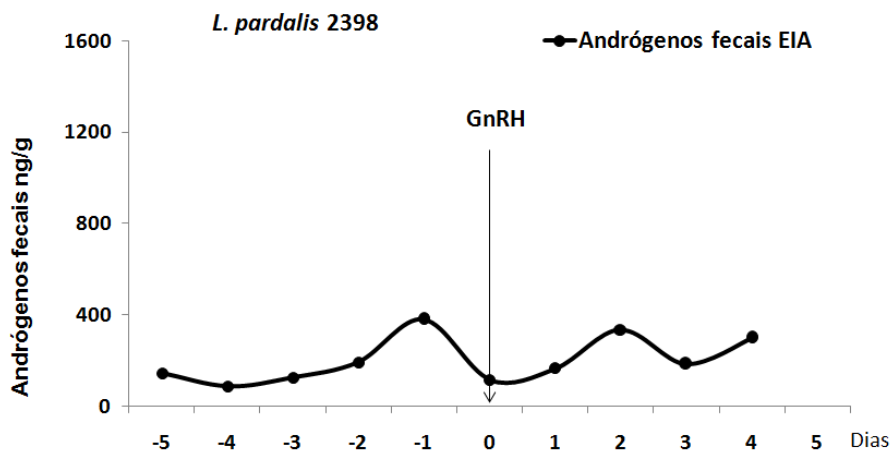


Figura 5 – *Leopardus pardalis* 2398 estimulado com análogo de GnRH com detecção de andrógenos fecais pelo método EIA

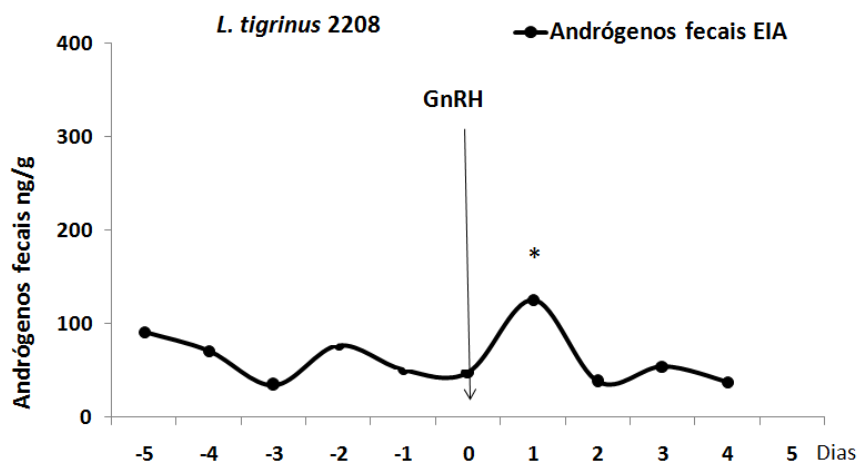


Figura 6 – *Leopardus tigrinus* 2208 estimulado com análogo de GnRH com detecção de andrógenos fecais pela método EIA. (*) Pico hormonal.

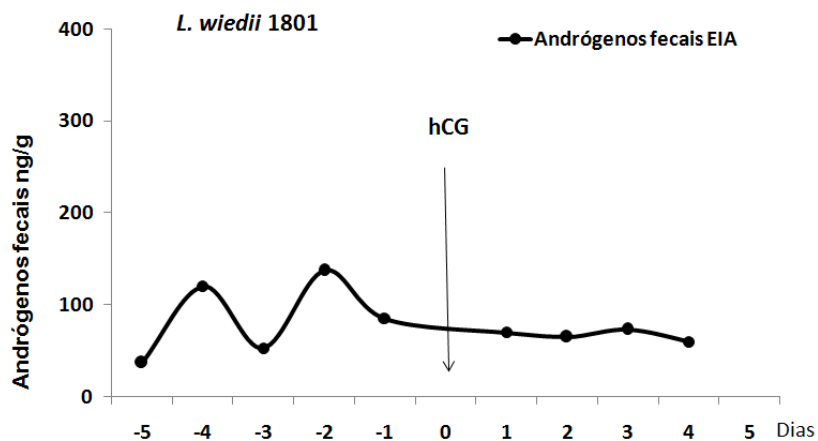


Figura 7 – *Leopardus wiedii* 1801 estimulado com análogo de hCG com detecção de andrógenos fecais pelo método EIA

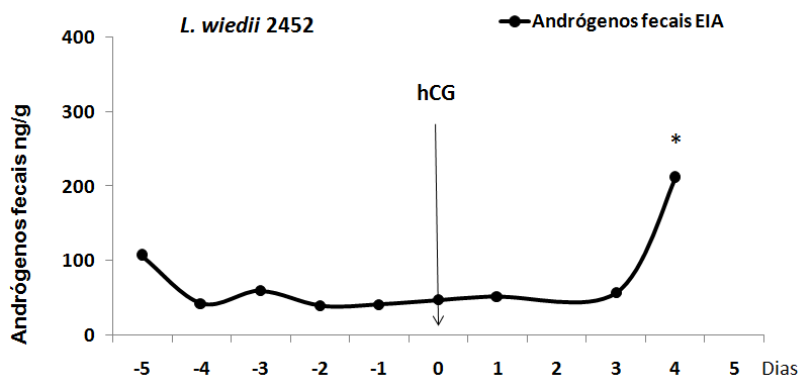


Figura 8 – *Leopardus wiedii* 2452 estimulado com análogo de hCG com detecção de andrógenos fecais pelo método EIA. (*) Pico hormonal.

Neste trabalho as maiores médias basais de andrógenos fecais ($254,39 \pm 227,13$ ng/g) foram encontradas em *L. pardalis* que corroboram os resultados encontrado por Morais *et al.* (2002) que descrevem valores médios para andrógenos fecais de maiores em *L. pardalis* (1240 a 2210 ng/g de fezes úmidas) comparados aos andrógenos fecais de *L. tigrinus* (190 a 250 ng/g de fezes úmidas) e andrógenos fecais de *L. wiedii* (120 a 180 ng/g de fezes úmidas). Dias *et al.* (2008) encontraram valores diferentes em corticoides fecais de *L. pardalis* quando utilizaram duas técnicas de extração fecal (WASSER *et al.* 1994; SCHWARZEMBERG *et al.* 1991) com o mesmo teste, indicando que as taxas de recuperação e identificação de metabólitos esteroidais são diferentes conforme o método empregado para extração. Os autores relataram que, apesar das diferenças de concentração encontradas, as variações endócrinas tiveram alta correlação. Já Keay *et al.* (2006) ponderaram que devem ser tomadas precauções quando se examina resultados de outros estudos, como diferenças nas técnicas e métodos que podem levar a resultados que não são adequados para comparação.

Vários autores identificaram variações no nível de testosterona entre espécies diferentes de felídeos (BROWN *et al.* 1988; MORAIS *et al.* 2002; WILDT *et al.* 1988)

confirmando que felídeos taxonomicamente relacionados exibem padrões endócrinos diferentes. Moreira (2007) apontou que o metabolismo de esteroides parece ser conservado dentro do táxon, porém as taxas de produção absoluta e ou excreção são mais espécie-específicas. Genaro *et al.* (2007) relataram que não foram observadas diferenças ($p>0,05$) nos níveis séricos basais de testosterona em machos de *L. pardalis*, *L. tigrinus* e *L. wiedii*.

Foi identificada resposta ao estímulo hormonal pelo análogo de GnRH em dois animais *L. wiedii* testados (2450 e 2409), com picos de detecção de andrógenos fecais e acima também do maior valor detectado no indivíduo, conforme expresso nas Figuras 1, 2 e 3, apresentando retorno aos níveis basais após três ou quatro dias.

Em um *L. wiedii* (2409^a) estimulado com análogo de GnRH foi percebido um aumento de corticoides fecais (155%) acima da média do período controle, entretanto com intensidade menor que animais estimulados com análogo de ACTH.

Nos *L. wiedii* (n=2) estimulados com hCG foi identificado um aumento (332%) de excreção de andrógenos fecais em apenas um animal estimulado (2452) e a não resposta ao estímulo no outro animal (1801), conforme demonstrado nas Figuras 7 e 8. Nestes dois animais estimulados com análogo de hCG não foi percebido aumento de metabólitos de cortisol fecal após as estimulações hormonais.

Em *L. pardalis* estimuladas com análogo de GnRH foram identificados aumento na detecção de andrógenos fecais após estímulo, nos dois animais testados (2323 e 2398), mas o animal 2398 não configurou um pico hormonal (média basal + 1,5 DP), conforme expresso na Figura 5. Não foram detectadas alterações significativas nos níveis de cortisol após estímulo com análogo de GnRH nestes animais.

Um *L. tigrinus* (2208) foi estimulado com análogo de GnRH e apresentou uma resposta detectável, com pico de andrógenos fecais, relativo à média basal deste animal, conforme mostra a Figura 6.

Wildt (1986) apontou que uma aplicação em *bolus* de análogo de GnRH, gonadorelina, em machos de *Neofelis nebulosa*, induziu um aumento acentuado de LH e testosterona no soro entre 15 e 30 minutos, respectivamente, indicando que estes dois hormônios respondem associados. Em *Felis catus*, após a injeção do análogo de GnRH, buserelina, foi verificado um aumento significativo de testosterona sérica em todos os animais após 60 e 90 minutos (GOERICK-PESCH, 2013). Genaro et al.(2007) observaram em felídeos estimulados com análogo de ACTH que *Felis catus* e *L. tigrinus* respondiam em 5 minutos com aumento dos níveis séricos de cortisol e que *L. wiedii* demoravam até 40 minutos para a mesma resposta e com a manutenção dos níveis elevados de cortisol por mais de 120 minutos, enquanto as outras espécies retornavam ao nível basal em 90 a 120 minutos.

Há um atraso entre o pico sérico do hormônio e o aparecimento do sinal respectivo nas fezes e isto foi intimamente relacionado com o tempo de trânsito intestinal dos animais do duodeno para reto (PALME *et al.*, 2005).

Amaral *et al.* (2009) verificaram resposta na produção de testosterona em *Trichechus inunguis* estimulados com análogo de GnRH, quando analisaram fluidos biológicos como saliva, urina e fezes, demonstrando que também nesta espécie, os eventos biológicos são consistentemente avaliados com dosagens endócrinas, embora a detecção do pico nas fezes tenha sido tardia, em decorrência do trânsito digestório lento, conforme sugerido pelo autor.

Rocha (2010) realizou validação biológica para dosagem de metabólitos testosterona e corticosterona fecal em *Callitrix penicillata*, com estímulo de GnRH e

ACTH exógenos, observando uma resposta na produção e na detecção destes compostos com testes de RIA. Chelini *et al.* (2011) identificaram resposta biológica em *Mesocricetus auratus* estimulados com GnRH.

Foram analisadas 24 amostras de extrato fecal de *L. wiedii*, que foram estimulados com GnRH, por dois métodos diferentes CLIA e EIA, na dosagem de metabólitos de testosterona e foi detectada alta correlação entre os testes ($r=0,929$ com $p<0,001$), caracterizando que ambos os métodos podem ser empregados na mensuração de andrógenos fecais desta espécie. Embora os valores basais tenham sido diferentes ($p=0,006$), a curva gráfica foi similar, conforme expresso nas Figuras 1, 2 e 3. Também ambos os testes mantiveram a linearidade em diluições seriadas ($r=0,989$ para EIA-testosterona e $r=0,998$ para CLIA-testosterona). Para a validação de ensaios endócrinos a primeira etapa é a verificação do paralelismo com a curva padrão. A curva padrão indica a sensibilidade do ensaio, com isso verifica-se a correlação entre quantidade de hormônio detectada e a diluição correta da amostra (PAZ *et al.*, 2009).

Jewgenow *et al.* (2006) também avaliaram concentrações de andrógenos fecais utilizando dois testes para detecção de testosterona (EIA com anticorpo fornecido por Prof. Meyer, Weihenstephan, Alemanha e CLIA Testosterone-Immulate, DPC, Biermann, Alemanha) em fezes de *Lynx lynx* e *Lynx pardinus* e reportou que a correlação entre os dois métodos foi altamente significativa. Também Grasso *et al.* (2002) realizaram estudos em humanos, com objetivo de comparar os resultados de testosterona com avaliação por uma nova enzima ligada à fluorescência (ELFA), com aqueles obtidos pelo método de quimioluminescência (CLIA) e radioimunoensaio (RIA), em diferentes situações. Em geral, uma boa correlação foi encontrada entre os resultados deste teste e os obtidos pelos outros dois métodos ($r=0.939$ e $r=0.925$ para

CLIA e RIA, respectivamente), caracterizando alternativas viáveis, conforme o custo de cada teste.

Neste trabalho um *L. wiedii* (2452) apresentou resposta tardia em quatro dias no aumento de andrógenos fecais, com o estímulo de hCG, mas este animal não apresentou defecação no dia anterior da detecção. O tempo de ação do hCG para elevar níveis séricos de testosterona em felídeos é de 30 a 120 minutos, conforme protocolo do *Endocrinology Laboratory of Cornell University* (2011) e Memon e Tibary (2001), mas deve ser considerado o tempo de transito intestinal do alimento. Já o outro animal (1801) testado não apresentou resposta ao estímulo do hCG, não sendo detectadas alterações nos níveis basais de andrógenos fecais.

Em testes endócrinos de humanos também é utilizado hCG, para estimulação gonadal, verificando a resposta no incremento da produção de testosterona sérica (GRASSO *et al.*, 2002).

Resultados de análises endócrinas em *Panthera onca* sugerem que efeitos da estimulação adrenal também afetem níveis de andrógenos. As concentrações de glicocorticoides variam não só entre espécies de felídeos, mas também entre indivíduos da mesma espécie (CONFORTI *et al.*, 2012). Neste trabalho em apenas um macho de *L. tigrinus* (1907) estimulado com ACTH foi identificado picos de produção de andrógenos fecais, nos demais animais não foi identificado este aumento.

Morato *et al.* (2004) não encontraram variações nos níveis de andrógenos fecais de *P. onca*, quando foram detectadas variações de corticoides fecais em animais submetidos a procedimentos de contenção química e eletroejaculação.

2 - Detecção de corticoides fecais

A detecção média (\pm DP) de corticoides fecais, sem estimulação endócrina, apresentou as médias similares ($p>0,05$) de para *L. wiedii* ($571,44 \pm 445,56$ ng/gde fezes) e para *L. pardalis* ($508,0,2 \pm 333,83$ ng/gde fezes) e inferiores ($p<0,01$) às médias basais de gatos-do-mato-pequeno ($992,13 \pm 647,53$ ng/gde fezes) utilizando-se o EIA.

L. wiedii, *L. tigrinus* e *L. pardalis* responderam ao estímulo com análogo de ACTH, havendo detecção de variação hormonal detectada pelo teste EIA-cortisol, com exceção de uma jaguatirica em que não foi detectado resposta ao estímulo. Nos animais estimulados com análogos de GnRH e hCG não foi percebido aumento de corticoides fecais, com exceção de um *L. wiedii* (2409^a).

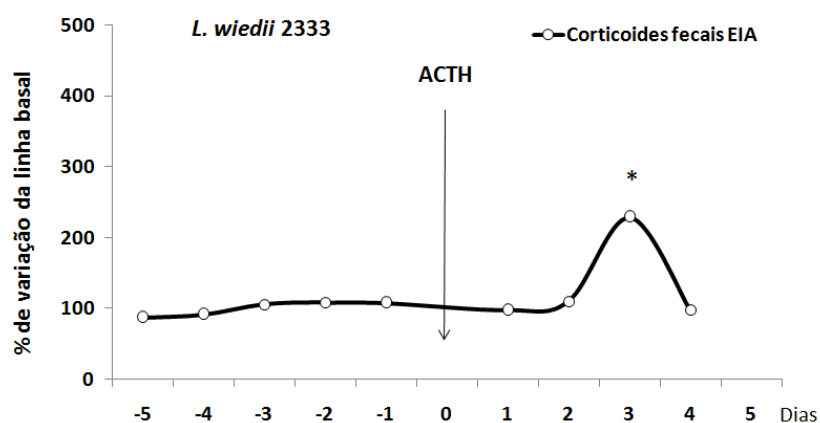


Figura 9 – *Leopardus wiedii* 2333 estimulado com análogo de ACTH com detecção de corticoides fecais pelo método EIA. (*) Pico hormonal.

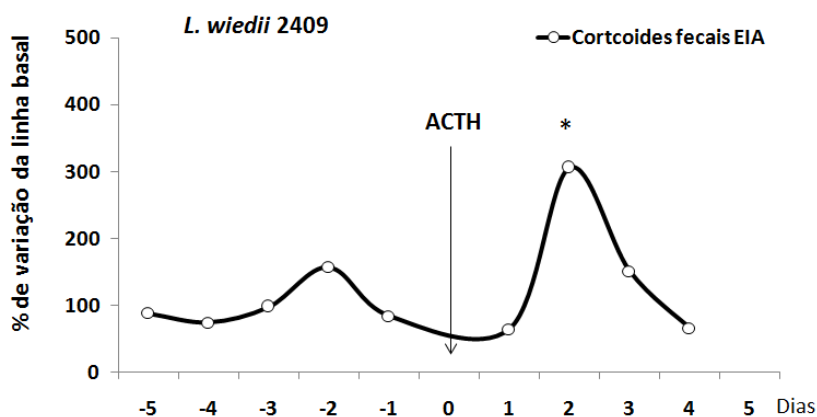


Figura 10 – *Leopardus wiedii* 2409 estimulado com análogo de ACTH com detecção de corticoides fecais pelo método EIA. (*) Pico hormonal.

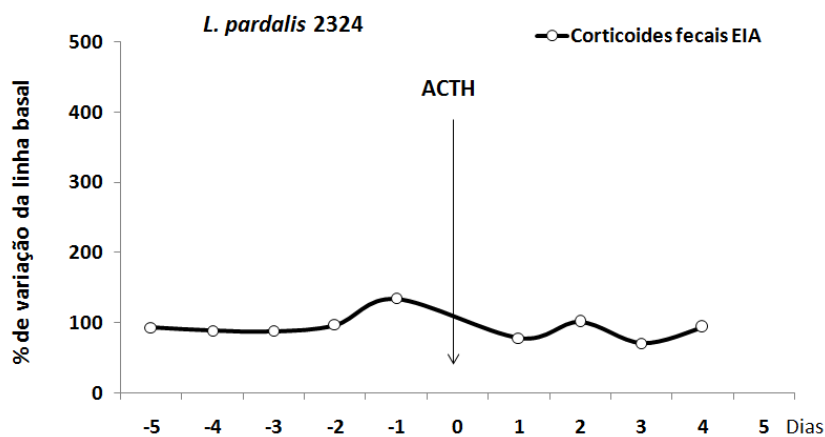


Figura 11 – *Leopardus pardalis* 2324 estimulado com análogo de ACTH com detecção de corticoides fecais pelo método EIA.

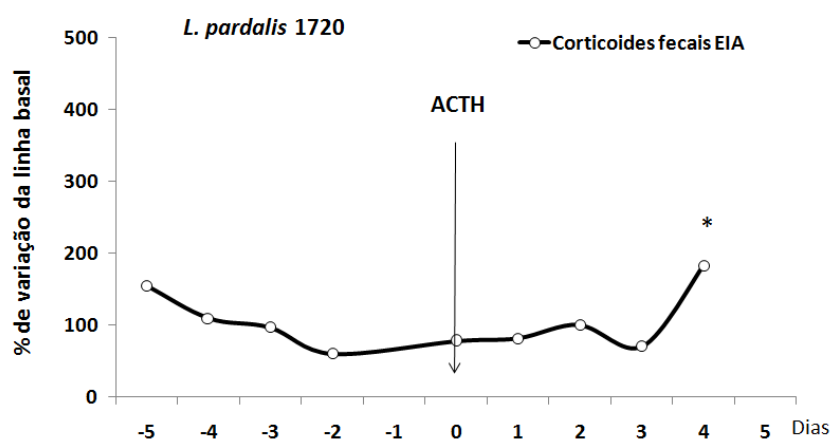


Figura 12– *Leopardus pardalis* 1720 estimulado com análogo de ACTH com detecção de corticoides fecais pelo método EIA. (*) Pico hormonal.

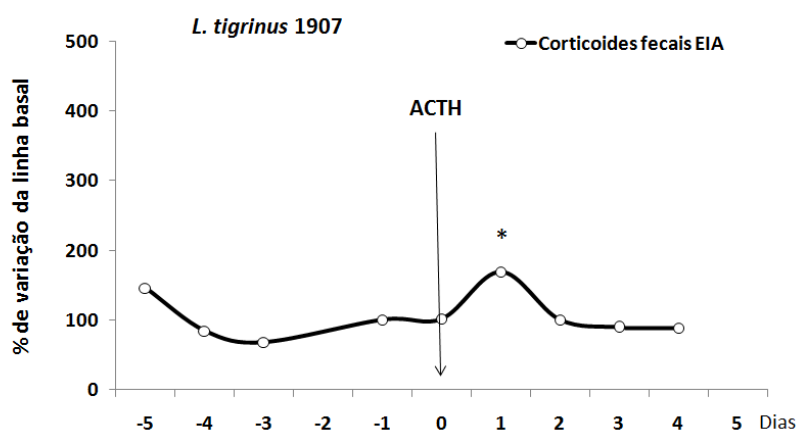


Figura 13– *Leopardus tigrinus* 1907 estimulado com análogo de ACTH com detecção de corticoides fecais pelo método EIA. (*) Pico hormonal.

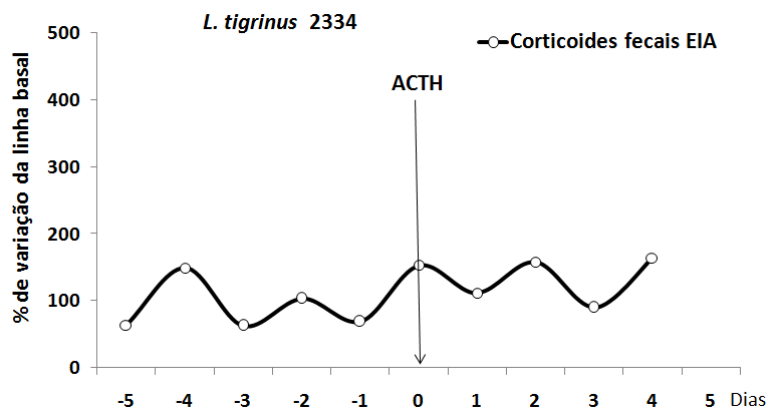


Figura 14 - *Leopardus tigrinus* 2334 estimulado com análogo de ACTH com detecção de corticoides fecais pelo método EIA.

Os valores basais de corticoides fecais para *Leopardus tigrinus* ($992,13 \pm 647,53$ ng/g de fezes) e *L. wiedii* ($571,44 \pm 445,56$ ng/g de fezes) demonstram uma excreção média maior destes metabólitos em *L. tigrinus* equivalente ao descritos por Moreira (2001) que cita valores médios maiores para *L. tigrinus* (395,8 a 1126,8 ng/g de fezes úmidas) comparado com *L. wiedii* (111,3 a 456,9 ng/g de fezes úmidas).

Para *L. wiedii* estimulados com análogo de ACTH o aumento de corticoides fecais foi identificado nos dois animais testados (2333 e 2409) com picos de 128% a 201% acima do período controle, conforme Figuras 9 e 10. Nestes mesmos animais estimulados com ACTH não foi identificada alteração nos níveis basais de andrógenos fecais antes ou após a aplicação do produto.

Nos *L. pardalis* estimuladas com análogo de ACTH (2324 e 1720) houve detecção de um pico nos corticoides fecais em apenas um animal (1720) e o outro macho (2324) não apresentou resposta ao estímulo hormonal ou o exame não foi capaz de detectar a resposta, estes dados foram expressos nas Figuras 11 e 12. Em ambos os animais não foram registradas alterações significativas nos níveis de andrógenos fecais após aplicação do análogo de ACTH. A não resposta ao estímulo pode ser inferido a fatores individuais ou da espécie, como baixa resposta ao ACTH,

resposta ineficiente da glândula supra-renal ou deficiência de receptoras ao análogo de ACTH.

Nos *L. tigrinus* (1907 e 2334) submetidos ao estímulo com análogo de ACTH, foi detectado um pico (média basal + 2 DP) com aumento entre 57% e 69% dos níveis de corticoides fecais após o estímulo (Figuras 13 e 14).

Young *et al.* (2004) consideraram significativo um aumento de metabólitos de glicocorticoides, após um estímulo de estresse exógeno, quando o valor mensurado ultrapassou valores basais médios mais 3 DP e como um pico médio quando o valor ultrapassou valores basais médios mais 1,5 DP. Morato (2004) considerou como pico quando o valor das dosagens de cortisol ultrapassara o valor basal mais 2 DP. Amaral *et al.* (2009), analisando resposta endócrina por andrógenos em *T. inunguis*, definiu como pico hormonal, valores que ultrapassavam o dobro do desvio interquartilico da mediana das amostras, mas também cita que pode ser considerada a média e o desvio padrão se houver amostras pré-tratamento para estabelecer uma linha basal.

É importante ressaltar que o *kit* utilizado Cortisol EIA-1887(DRG) apresenta reatividade cruzada com 100% cortisol e 45% corticosterona, portanto uma ligação maior com metabólitos de estrutura próxima ao cortisol, podendo ser o responsável pelas baixas detecções de corticoides fecais em *L. pardalis* e *L. tigrinus*.

Conforti *et al.* (2012) utilizaram ACTH manipulado (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), para estimulação endócrina de *P. onca* com resultados satisfatórios na detecção utilizando *kit* para corticosterona-RIA (MP Biomedicals, Solon, OH, EUA).

Há grandes variações nos níveis de glicocorticoides fecais e seus metabólitos entre as espécies animais. Monitorização de glicocorticoides fecais foi executada em uma grande variedade de espécies de mamíferos, bem como em várias espécies de aves e peixes (KEAY *et al.*, 2006).

Muitas vezes, os *kits* disponíveis comercialmente de cortisol ou corticosterona são utilizados para mensuração de glicocorticoides fecais. No entanto, os anticorpos utilizados nestes ensaios podem ter algumas deficiências, porque são produzidos principalmente para medir o respectivo esteroide não metabolizado no plasma. Young *et al.*(2004) encontraram correlações significativas ($r=0,652$ a $0,975$ com $p<0,001$) entre os metabólitos de glicocorticoides quantificadas por EIA-cortisol e corticosterona-RIA, em fezes de seis carnívoros de diferentes espécies. Apenas nos *Mustela putorius furo* houve baixa correlação ($r=0,383$). Em carnívoros o *kit* comercial de corticosterona (RIA) (ICN Biomedicals, Costa Mesa, CA) detectou maiores respostas adrenocorticais ao ACTH exógeno ou de estímulos estressantes em *Ursus thibetanus*, *Felis catus* (fêmeas), *Acinonyx jubatus*, *Neofelis nebulosa*, *Suricata suricatta* e em *Canis rufus*, enquanto o cortisol (EIA) (Munro, University of Califórnia, Davis, CA) mostrou-se superior para detectar respostas adrenocorticais em *Mustela putorius furo* e no *Felis catus* (macho), sendo que, todas estas espécies responderam os estímulos do ACTH exógeno e foram detectados pelos dois testes, gerando picos de corticoides fecais, entre um a dois dias após aplicação e retornando aos níveis basais na sequência e os autores concluíram que ambos os testes são adequados para o monitoramento de atividade adrenocortical em carnívoros (YOUNG *et al.*, 2004). Paz *et al.* (2007) e Dias *et al.* (2008) realizaram ensaios para dosagem de metabólitos de glicocorticoides fecais de *L. pardalis* utilizando dois conjuntos comerciais de radioimunoensaio (RIE), sendo um para detecção de corticosterona (ICN, Biomedicals) e outro para detecção de cortisol (DPC), observando um melhor desempenho em identificação de metabólitos de glicocorticoides no conjunto para detecção de corticosterona (ICN, Biomedicals).

3 – Kits utilizados

Os kits DRG Testosterone ELISA EIA-1559 e DRG Cortisol ELISA EIA-1887, reportados neste trabalho, já foram utilizados para dosagens hormonais em *Cervus elaphus hispanicus* (GASPAR-LOPEZ *et al.*, 2010), cortisol em *Capreolus capreolus* (MONTANÉ *et al.*, 2003) e *Sus scrofa* (Salajpal *et al.*, 2007); testosterona em *Bubalus bubalis* (EL-KHAWAGA *et al.*, 2012), em *Ratus norvegicus* (JUAN *et al.* 2005) e em aves *Crex crex* (REK *et al.*, 2011).

Conclusões

Os kits DRG Testosterone EIA-1559 e DRG Cortisol EIA-1887 foram eficazes para identificar alterações endócrinas de andrógenos fecais e corticoides fecais, respectivamente, em machos de *L. wiedii*, *L. pardalis* e *L. tigrinus*, considerando que pelo menos um animal de cada espécie respondeu aos estímulos hormonais sendo assim detectado pelos testes. Existem variações individuais nas respostas para estímulos endócrinos com análogos de GnRH e ACTH em machos dessas espécies. Os anticorpos utilizados nestes testes são produzidos para mensurações séricas e podem sofrer deficiências para detecção de metabólitos esteroidais fecais. Houve boa correlação ($r=0,9299$ com $p<0,0001$) entre os Kits DRG Testosterone EIA-1559 e Access Testosterone assay 33560 na detecção de andrógenos fecais de *L. wiedii*. Todos os kits utilizados apresentaram boa linearidade em diluições seriadas.

Referências

BROWN, J. L., GOODROWE, K. L., SIMMONS, L. G., ARMSTRONG, D. L., & WILDT, D. E. Evaluation of the pituitary–gonadal response to GnRH, and adrenal status, in the leopard (*Panthera pardus japonensis*) and tiger (*Panthera tigris*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 82, n. 1, p. 227-236, 1988.

BROWN, J. L. Comparative endocrinology of domestic and nondomestic felids. **Theriogenology**, v. 66, n. 1, p. 25-36, 2006.

CHELINI, MO M.; OLIVEIRA, C. A.; OTTA, E. Validação de um radioimunoensaio para a quantificação de metabólitos fecais de testosterona em hamster Sírio (*Mesocricetus auratus*). **Pesq. Vet. Bras**, v. 31, n. 5, p. 459-463, 2011.

CONFORTI, V. A., MORATO, R. G., AUGUSTO, A. M., DE OLIVEIRA E SOUSA, L., DE AVILA, D. M., BROWN, J. L., & REEVES, J. J. Noninvasive monitoring of adrenocortical function in captive jaguars (*Panthera onca*). **Zoo Biology**, v. 31, n. 4, p. 426-441, 2012.

DA ROCHA, Cíntia Germano. **Estudo dos perfis de metabólitos hormonais urinários e fecais de cortisol e testosterona em machos de sagui-de-tufos-pretos (*Callithrix penicillata*, Geoffroy, 1812) submetidos à contenção física.** Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo (USP). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

DE SOUZA AMARAL, R., ROSAS, F. C. W., VIAU, P., D'AFFONSÊCA NETO, J. A., DA SILVA, V. M. F., & DE OLIVEIRA, C. A. Noninvasive monitoring of androgens in male Amazonian manatee (*Trichechus inunguis*): biologic validation. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 40, n. 3, p. 458-465, 2009.

DIAS, E. A.S; NICHI, M.; GUIMARÃES, M.A.B.V. Comparison of two commercial kits and two extraction methods for fecal glucocorticoid analysis in ocelots (*Leopardus pardalis*) submitted to ACTH challenge. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 7, p. 329-334, 2008.

EL-KHAWAGA, A. R., KANDIEL, M. M., SOSA, G. A., EL-ROOS, M. E. A., ABDEL-GHAFFAR, A. E., & ABD EL SALAM. Ultrasound imaging of the testes and accessory sex glands in buffalo bulls treated with gonadotrophic releasing hormone. **Journal of Reproduction and Infertility**, v. 3, n. 1, p. 08-16, 2012.

GASPAR-LÓPEZ, E., LANDETE-CASTILLEJOS, T., ESTEVEZ, J. A., CEACERO, F., GALLEGO, L., & GARCÍA, A. J. Biometrics, testosterone, cortisol and antler growth cycle in Iberian red deer stags (*Cervus elaphus hispanicus*). **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 2, p. 243-249, 2010.

GENARO, G., MORAES, W., SILVA, J.C., ADANIA, C.H., FRANCI, C.R.,. Plasma hormones in Neotropical and domestic cats undergoing routine manipulations. **Research in Veterinary Science**, v. 82, n. 2, p. 263-270, 2007.

GOERICKE-PESCH, S., GEORGIEV, P., FASULKOV, I., VODENICHAROV, A., & WEHREND, A. Basal testosterone concentrations after the application of a slow-release GnRH agonist implant are associated with a loss of response to buserelin, a short-term GnRH agonist, in the tom cat. **Theriogenology**, v.80, n.1, p.65-9, 2013.

GRASSO, L FRAGOMENI, F; CECCONI, E; GASPERI, M. Comparison of VIDAS testosterone assay with chemiluminescence and RIA methods. **Fertility and Sterility**, v.78, n. null, p. S261, 2002

IUCN. CASO, A., LOPEZ-GONZALEZ, C., PAYAN, E., EIZIRIK, E., DE OLIVEIRA, T., LEITE-PITMAN, R., KELLY, M. & VALDERRAMA, C. 2008. *Leopardus pardalis*. In: IUCN 2012. **IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2.** <www.iucnredlist.org>. acessado 13 out 2013.

JEWGENOW, K., NAIDENKO, S. V., GOERITZ, F., VARGAS, A., & DEHNHARD, M. Monitoring testicular activity of male Eurasian (*Lynx lynx*) and Iberian (*Lynx pardinus*) lynx by fecal testosterone metabolite measurement. **General and comparative endocrinology**, v. 149, n. 2, p. 151-158, 2006.

JUAN M. E.; GONZALEZ-PONS, E., MUNUERA T., BALLESTER, J., RODRIGUEZ-GIL J. E., AND PLANAS, J. M. trans-Resveratrol, a Natural Antioxidant from Grapes, Increases Sperm Output in Healthy Rats. **Nutrient Metabolism**. v.135: p.757–760, 2005.

KEAY, J. M., SINGH, J., GAUNT, M. C., & KAUR, T. Fecal glucocorticoids and their metabolites as indicators of stress in various mammalian species: a literature review. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 37, n. 3, p.234-244, 2006.

LÓPEZ-OLVERA J.R., MARCO, I., MONTANÉ, J., CASAS-DÍAZ E., LAVÍN S. Effects of acepromazine on the stress response in Southern chamois (*Rupicapra pyrenaica*) captured by means of drive-nets. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 71, n. 1, p. 41, 2007.

MEMON, M.; TIBARY, A. Canine and feline cryptorchidism. **Recent advances in small animal reproduction. Ithaca (NY): International Veterinary Information Services**, 2001.

MONTANÉ, J., MARCO, I., LOPEZ-OLVERA, J., MANTECA, X., & LAVIN, S. Transport stress in roe deer (*Capreolus capreolus*): effect of a short-acting antipsychotic. **Animal Welfare-potters Bar Then Wheathampstead**, v. 11, n. 4, p. 405-418, 2002.

MORAIS, R.N.; MUCCIOLO, R.G.; GOMES, M.L.F.; LACERDA, O.; MORAES, W.; MOREIRA, N.; GRAHAM, L.H.; SWANSON, W.F.; BROWN, J.L. Seasonal analysis of semen characteristics, serum testosterone and fecal androgens in the ocelot (*Leopardus pardalis*), margay (*L. wiedii*) and tigrina (*L. tigrinus*). **Theriogenology**, p.2027-2041. 2002.

MORATO, R. G., BUENO, M. G., MALMHEISTER, P., VERRESCHI, I. T. N., & BARNABE, R. C. Changes in the fecal concentrations of cortisol and androgen metabolites in captive male jaguars (*Panthera onca*) in response to stress. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 12, p. 1903-1907, 2004.

MOREIRA, N., BROWN, J. L., MORAES, W., SWANSON, W. F., & MONTEIRO-FILHO, E. L. A. Effect of housing and environmental enrichment on adrenocortical

activity, behavior and reproductive cyclicity in the female tigrina (*Leopardus tigrinus*) and margay (*Leopardus wiedii*). **Zoo Biology**, v. 26, n. 6, p. 441-460, 2007.

MOREIRA, N. **Reprodução e estresse em fêmeas de felídeos do gênero *Leopardus***. 2001. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná.

OTTINGER, M. A.; WU, J.; PELICAN, K. Neuroendocrine regulation of reproduction in birds and clinical applications of GnRH analogues in birds and mammals. In: **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**. WB Saunders, p. 71-79. 2002.

PALME, R., RETTENBACHER, S., TOUMA, C., EL-BAHR, S. M., & MÖSTL, E. Stress hormones in mammals and birds: comparative aspects regarding metabolism, excretion, and noninvasive measurement in fecal samples. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1040, n. 1, p. 162-171, 2005.

PAZ, R. D., ADANIA, C. H., OLIVEIRA, C. D., & BARNABE, R. C. Progesterone and estradiol commercial kits validation in serum of ocelots (*Leopardus pardalis*) and tigrina (*Leopardus tigrinus*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 46, n. 3, p. 237-244, 2009.

PEREIRA, R.J.G; Métodos não-invasivos para análises hormonais aplicadas aos estudos de ecologia e etologia. **R. Bras. Zootec.**, v.36, *Suplemento especial*, p.71-76, 2007

REK, P.; OSIEJUK, T. S.; BUDKA, M. Functionally similar acoustic signals in the corncrake (*Crex crex*) transmit information about different states of the sender during aggressive interactions. **Hormones and Behavior** v.60, p.706–712. 2011.

SALAJPAL, K., ĐIKIĆ, M., KAROLY, D., ŠURINA, J., MATAKOVIĆ, M., & LIKER, B. Effect of MC4R polymorphism on physiological stress response in pigs. **Poljoprivreda**, v. 13, n. 1, p. 46-50, 2007.

SCHWARZEMBERGER, F. et al. Concentration of progestagens and oestrogens in the faeces of pregnant Lipizzan, Trotter and Thoroughbred mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 44, p. 489-499, 1991.

SILVA, Tatiane Micheletti Ribeiro. **O uso de altrenogest para protocolos de reprodução assistida em gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*)**. Dissertação. Universidade Federal do Paraná, 2010.

SWANSON, W. F., JOHNSON, W. E., CAMBRE, R. C. et al. Reproductive status of endemic felid species in Latin American zoos and implications for ex situ conservation. **Zoo Biol.**, v.. 22, p. 421–441, 2003.

TOUMA, C.I. & PALME, R. Measuring fecal glucocorticoid metabolites in mammals and birds: the importance of validation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1046, n. 1, p. 54-74, 2005.

WASSER, S. K., HUNT, K. E., BROWN, J. L., COOPER, K., CROCKETT, C. M., BECHERT, U., & MONFORT, S. L. A generalized fecal glucocorticoid assay for use

in a diverse array of nondomestic mammalian and avian species. **General and Comparative Endocrinology**, v. 120, n. 3, p. 260-275, 2000.

WASSER, S. K., MONFORT, S. L., SOUTHERS, J., & WILDT, D. E.. Excretion rates and metabolites of oestradiol and progesterone in baboon (*Papio cynocephalus cynocephalus*) faeces. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 101, n. 1, p. 213-220, 1994.

WILDT, D. E., HOWARD, J. G., CHAKRABORTY, P. K., & BUSH, M. Reproductive physiology of the clouded leopard: II. A circannual analysis of adrenal-pituitary-testicular relationships during electroejaculation or after an adrenocorticotropin hormone challenge. **Biology of reproduction**, v. 34, n. 5, p. 949-959, 1986.

WILDT, D. E., PHILLIPS, L. G., SIMMONS, L. G., CHAKRABORTY, P. K., BROWN, J. L., HOWARD, J. G. & BUSH, M. A comparative analysis of ejaculate and hormonal characteristics of the captive male cheetah, tiger, leopard, and puma. **Biology of Reproduction**, v. 38, n. 2, p. 245-255, 1988.

YOUNG, K. M., WALKER, S. L., LANTHIER, C., WADDELL, W. T., MONFORT, S. L., & BROWN, J. L. Noninvasive monitoring of adrenocortical activity in carnivores by fecal glucocorticoid analyses. **General and Comparative Endocrinology**, v. 137, n. 2, p. 148-165, 2004.

ARTIGO 5 - Monitoramento reprodutivo e endócrino de machos de gato-maracajá (*Leopardus wiedii* Schinz, 1821) e testes de criopreservação de sêmen

ARTICLE 5 - Reproductive and endocrine monitoring male margay (*Leopardus wiedii* Schinz, 1821) and tests of sperm cryopreservation

Formatado nas normas da revista:

Archives of Veterinary Science
ISSN: 1517-784X

Monitoramento reprodutivo e endócrino de machos gato-maracajá (*Leopardus wiedii* Schinz, 1821) e testes de criopreservação de sêmen

Reproductive and endocrine monitoring margay's male (*Leopardus wiedii* Schinz, 1821) and tests of sperm cryopreservation

Resumo

O gato-maracajá (*Leopardus wiedii* Schinz, 1821) é um felídeo neotropical pouco estudado, com populações naturais em declínio, onde estudos de fisiologia reprodutiva e o uso de técnicas de reprodução assistida são necessários para o incremento de programas de conservação. Machos de *L. wiedii* (n=6) cativos foram avaliados quanto a sua eficiência reprodutiva em cativeiro, através de monitoramento de andrógenos fecais, exames clínicos, coletas de sêmen por eletroejaculação (n=30), pareamentos com fêmeas da espécie (n=5) e criopreservação seminal. Foi identificado que todos os animais apresentavam-se hígidos e com bom estado nutricional. Todos os machos produziram sêmen, mas um animal foi azoospérmico em todas as coletas e outro animal foi azoospérmico na maioria das coletas (4/5). O sêmen apresentou um baixo número de espermatozoides viáveis ($8,44 \pm 1,95 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$) com $46,29\% \pm 3,79$ de alterações morfológicas. Cinco machos e cinco fêmeas foram pareados por 70 dias, gerando apenas um filhote. O pareamento com fêmeas não influenciou o nível de andrógenos fecais ($p=0,995$) ou a produção média de espermatozoides viáveis ($p=0,469$) mensurados antes e após o período. Entretanto, um animal identificado com azoospérmico apresentou produção espermática após período de pareamento. Também foram testados dois criodiluentes para congelação de sêmen: **A)** (TYB) *Test Yolk Buffer*® e **B)** (MED) *AndroMed*® CSS *single stepe* para

duas curvas de criopreservação diferentes: **a)** curva TK de congelação em equipamento automatizado (*TK 3000®*) com taxas de resfriamento $-0,25^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e congelação de $-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e **b)** curva GEL com resfriamento e estabilização em geladeira de 20 a 5°C em duas horas e congelação em caixa de isopor em 4 minutos em plataformas de 8 cm e 3 cm acima do nitrogênio, apresentando melhores resultados com o diluente *TYB* associado à curva TK, quando considerados a motilidade e o vigor do sêmen ($p=0,0004$), atividade mitocondrial ($p=0,0001$) e sobrevivência espermática por duas horas ($p=0,0002$), já para índices de lesão acrossomal e integridade de membrana do sêmen descongelado não foram identificadas diferenças entre os protocolos ($p=0,142$) e ($p=0,288$) respectivamente.

Abstract

The margay cat (*Leopardus wiedii* Schinz, 1821) is a Neotropical felid with natural populations in decline, which studies of reproductive physiology and the use of assisted reproductive technologies are needed as conservation tools. *L. wiedii* ($n=6$) were evaluated for reproductive efficiency in captivity, through fecal androgens monitoring, clinical examination, semen collection by electroejaculation ($n=30$), pairing with females ($n=5$) and semen cryopreservation. It was identified that all animals presented themselves healthy and in good nutritional status. All males produced semen, but one animal was azoospermic in all collection procedures and other animal was azoospermic in most samples (4/5). The semen showed a low rate of mobile sperm ($8.44 \pm 1.95 \times 10^6$ sptz/ml) with high morphological defects ($46.29 \pm 3.79\%$). Five males and five females were paired for 70 days, generating only one puppy. The pairing with females did not influence the level of fecal androgens ($p=0.995$) or the average production of viable sperm ($p=0.469$) measured before and after the period.

Two cryodiluents were also tested for semen freezing: A) (TYB) Test Yolk Buffer® and B) (MED) Andromed® CSS single step and two cryopreservation curves: a) TK freezing curve in automated equipment (TK 3000®) with cooling rates - 0.25°C/min and freezing -20°C/min and b) GEL curve with cooling and stabilization in refrigerator 20-5°C in two hours and freezing in a styrofoam box in 4 minutes in 8 cm and 3 cm above the nitrogen platforms, showing better results with TYB diluent associated TK curve, when considered sperm motility ($p=0.0004$), mitochondrial activity ($p=0.0001$) and sperm survival for two hours ($p=0.0002$), while for index lesion and acrossosomal membrane integrity of thawed sperm were not identified differences between protocols ($p>0.05$).

Introdução

O gato-maracajá (*Leopardus wiedii* Schinz, 1821) é uma espécie de pequeno felídeo neotropical com ocorrência natural em planícies tropicais do sul do México através da América Central, na bacia do Amazonas e no sul do Brasil e Paraguai. Também ocorre marginalmente no norte da Argentina e no Uruguai, juntamente com matas ciliares, raramente tem sido registrado nos Andes. É considerada pouco ameaçada, mas apresenta populações em declínio e por ser uma espécie que sofre mais que seus congêneres nas destruições de florestas. Mais estudos são recomendados sobre a ecologia da espécie, demografia, história natural e ameaças (IUCN, 2013).

O L. *wiedii* é uma espécie pouco estudada. Dados reprodutivos e endócrinos foram apresentados por poucos pesquisadores na literatura científica internacional (HOWARD, 1993; MOREIRA *et al.*, 2001; MORAIS *et al.*, 2002; SWANSON *et al.*, 2003; BROUSET, 2003; GENARO *et al.*, 2007) e com apenas um trabalho abordando

criopreservação seminal (SWANSON *et al.*, 2003), portanto, comparações entre protocolos ficam restritas ou precisam ser extrapoladas para outras espécies.

Populações em cativeiro de pequenos felídeos muitas vezes são compostas de menos de 50 indivíduos, que são geograficamente dispersos, tornando-os difíceis de estudar em números cientificamente significativos (SWANSON E WILDT, 1997). Informações fisiológicas básicas são essenciais para o desenvolvimento e aplicação de técnicas de reprodução assistida, como a indução da ovulação, a inseminação artificial (IA), fertilização *in vitro*, transferência de embriões (TE) e de banco de reserva genômica (SWANSON E WILDT, 1997).

A capacidade de monitorar a atividade gonadal e adrenal através de hormônios e o monitoramento reprodutivo é fundamental para melhorar a saúde e a eficiência reprodutiva. Através de décadas de estudo aprendeu-se muito sobre a biologia de *Felis catus*, incluindo a função endócrina. Mais recentemente, estudos comparativos endócrinos têm expandido a base de conhecimento dos felídeos neotropicais (MOREIRA *et al.*, 2001; MORAIS *et al.*, 2002 ; MORATO *et al.*, 2004; GENARO *et al.*, 2007; MOREIRA *et al.*, 2007). Isto tem sido possível em grande parte através do desenvolvimento de técnicas não invasivas de monitoramento de esteroides fecais, que atualmente é o método de escolha para a monitoração da função endócrina em espécies selvagens, incluindo felídeos (BROWN *et al.*, 2006).

Um diluente ideal para congelamento de sêmen felídeo ainda não foi definido, visto que o movimento progressivo e a morfologia acrossomal são altamente afetados nos procedimentos de criopreservação com os diluentes conhecidos (LUVONI *et al.*, 2003). Vários agentes crioprotetores são usados para diminuir os danos nos espermatozoides. Os mais amplamente aceitos baseiam-se em glicerol e ou gema de ovo.

Índices encontrados no descongelamento de sêmen de felídeos do gênero *Leopardus* apontam para um melhor resultado final do diluente *Test Yolk Buffer* (TYB) (vide capítulos 2 e 3 desta tese). O TYB, uma mistura de gema de ovo, glicerol, gentamicina e solução tampão, já foi testado em estudos de felídeos [CROSIER *et al.*(2009) em *Acinonyx jubatus*; STOOPS *et al.*(2007) em *Leopardus pardalis*; ERDMANN (ver capítulo 3 e 4 da tese) em *Leopardus pardalis* e *Leopardus tigrinus*], mostrando boa qualidade do sêmen após descongelamento nestas espécies, mas ainda não havia sido descrito em *L. wiedii*. O outro produto testado, o Andromed (MED), para uso em bovinos, é um meio de congelação com base em glicerol, açúcares e solução tampão, sem gema de ovo e é oferecido como uma possível alternativa para substituir o TYB. Apesar do MED ser amplamente utilizado, principalmente para sêmen bovino, não existem dados confiáveis sobre sua eficácia em felídeos. Jimenéz *et al.* (2013) testaram o diluente MED em sêmen oriundo de epidídimo de *Felis catus* e demonstraram baixos índices de qualidade final do sêmen descongelado.

Este trabalho teve como objetivo avaliar o desempenho reprodutivo de *L. wiedii* machos em cativeiro, realizar avaliações andrológicas e testar protocolos de criopreservação de sêmen com diluentes comerciais, disponíveis para outras espécies, bem como testes de curvas de congelação em equipamento automatizado ou utilizando geladeira e caixa térmica com nitrogênio.

Material e métodos

1 –Aprovação

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética e Uso Animal (CEUA) do Setor Palotina da UFPR, sob o número 26/2010 e também pelo Ministério do Meio Ambiente, com autorização SISBIO nº38908-1.

2 - Animais e monitoramento reprodutivo

Foram utilizados machos (n=6) e fêmeas (n=5) adultos de *L. wiedii*, conforme apresentados na Tabela 1, mantidos em cativeiro, alguns provenientes da natureza e outros nascidos em cativeiro, todos alojados inicialmente em recintos individuais (3,43 x 1,61 x 2,0 m) no Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional (CASIB), localizado em Foz do Iguaçu – PR (25°32'45"Sul, 54°53'07" Oeste). Os animais receberam dieta controlada, com suplementação vitamínica e mineral em local onde não era permitido acesso público para visitação.

Tabela 1- Dados biológicos dos machos e fêmeas utilizados no trabalho, oriundos do Refúgio Biológico Bela Vista da Itaipu Binacional, Foz do Iguaçu - PR.

Animal	Sexo	Idade	Histórico reprodutivo	Origem
2333	Macho	7 anos - Estimado	Já reproduziu	Natureza
1495	Macho	16 anos	Já reproduziu	Cativeiro
1883	Macho	12 anos	-	Cativeiro
1851	Macho	12 anos	-	Cativeiro
2409	Macho	4 anos	-	Cativeiro
1801	Macho	13 anos	Já reproduziu	Cativeiro
2100	Fêmea	9 anos	Já reproduziu	Cativeiro
2402	Fêmea	4 anos - Estimado	Já reproduziu	Natureza
2412	Fêmea	4 anos	Já reproduziu	Cativeiro
2450	Fêmea	2 anos	-	Cativeiro
2209	Fêmea	7 anos	-	Cativeiro

Os machos (n=6) de *L. wiedii* foram acompanhados por um período de 225 dias, entre março e outubro de 2012, sendo realizadas coletas semanais de amostras fecais, para monitoramento endócrino. Entre os dias d-95 e d-165 do experimento, cinco machos foram pareados com fêmeas (n=5) da espécie, em recintos maiores

(7,00 x 2,95 x 4,15m), por um período de 70 dias, para programa de reprodução da espécie (Tabela 1).

Todos os machos (n=6) foram submetidos a exames físicos, exames andrológicos e colheita de sêmen por eletroejaculação em três ocasiões antes do período de pareamento e em duas ocasiões após o período de pareamento, todas com intervalo superior de 30 dias entre os procedimentos. As amostras de sêmen com motilidade espermática acima de 50% foram submetidas a testes de protocolo de criopreservação.

3– Coleta e processamento das amostras fecais.

As amostras fecais foram coletadas em sua totalidade do bolo fecal, acondicionadas em sacos plásticos tipo *zip lock*, identificadas com o número do animal, número do recinto e data da coleta e armazenadas em freezer a -20°C. O descongelamento se processou em temperatura ambiente e as amostras foram processadas com um protocolo modificado de Schwarzenberger *et al.* (1991) similar ao descrito por Jewgenow (2006), resumidamente, para extração dos metabólitos fecais em meio alcoólico, consistiu em pesar $0,50 \pm 0,02$ g de fezes úmidas bem homogêneas e colocadas em tubos de ensaio identificados de acordo com o saco plástico utilizado para coleta; Adicionar 5 ml de metanol 90% (metanol PA 90; H₂O 10) a cada tubo; Os tubos contendo as soluções foram homogêneos em um Vórtex por 15 minutos; As amostras então foram centrifugadas a 1500 G durante 15 minutos; Após a centrifugação foram recuperados 2 ml do sobrenadante e acondicionados em um criotubo com tampa rosqueada, com a identificação da amostra.

As amostras foram diluídas em solução tampão PBS 1:4 e dosadas com ensaio por quimioluminescência para testosterona, visando quantificar metabólitos

andrógenos fecais, conforme descrito no capítulo 4 desta tese. Para análise foi utilizado o *kit Access Testosterone assay 33560* (Beckman Coulter, Inc. 250 S. Kraemer Blvd. Brea, CA 92821 EUA) para dosagem de testosterona no extrato fecal das amostras. O princípio do teste é um ensaio imunoenzimático de ligação competitiva, utilizando anticorpo monoclonal anti-testosterona de rato, conjugado de testosterona alcalina, partículas paramagnéticas de anticorpo policlonal anti-testosterona de rato e substrato quimioluminescente, apresentando reatividade cruzada com 100% testosterona; 0,3% sulfato de testosterona; 2% 5 α dihidrotestosterona; 0,7% androstenediona; 6,7% cetotestosterona; 4,1% 11 β hidroxitesterona; 0% estradiol; <0,1% progesterona; <0,4% cortisol; <0,1% estrona.

3 – Colheita de sêmen

Para exames clínicos e colheitas de sêmen foi utilizado um protocolo anestésico composto de uma associação de cloridrato de cetamina (S+) 15 mg kg⁻¹, midazolam 1 a 1,5 mg kg⁻¹ e meperidina 4 mg kg⁻¹. Após a anestesia, todos os animais foram submetidos à criteriosa avaliação clínica, abrangendo estado nutricional, pesquisa de dermatopatias, aferição de parâmetros fisiológicos, palpação abdominal e musculoesquelética, radiografias torácicas, exame da cavidade oral, exame oftalmológico direto, eletrocardiografia e exame andrológico externo. O sêmen foi obtido utilizando um eletroejaculador específico para animais selvagens (PT Electronics, modelo 303, EUA). O transdutor usado possuía comprimento de 12,6 cm e diâmetro de 1,0 cm, com comprimento dos três eletrodos de 2,1 cm e distância entre os eletrodos de 0,7 cm. O protocolo de eletroejaculação utilizado foi o proposto por Howard (1993) e consistiu em um total de 80 estímulos elétricos de 2 a 5 V aplicados em três séries (30, 30 e 20 estímulos). Os frascos coletados permaneciam em

plataformas suporte de isopor em temperatura ambiente controlada de 20°C, até a avaliação e processamento.

Ao final da colheita, as alíquotas obtidas com presença de espermatozoides móveis eram combinadas. A análise do sêmen realizada no local avaliou: volume (com auxílio de uma micropipeta), motilidade (0-100%) e vigor (0-5), quando foi calculado o IME com a fórmula: $IME = [Motilidade (\%) + (vigor\ espermático \times 20)]/2$ para cada alíquota. Para isso foi utilizado um microscópio ótico com aumento de 100X, equipado com placa aquecedora. Aferição do pH com fita (Merck®, Darmstadt, Alemanha). A concentração foi avaliada pela contagem de células em câmara hematómica de *Neubauer*, após uma alíquota de 5µl de sêmen ser adicionada a 200 µl de solução de formol-citrato, levando-se em consideração a diluição realizada. Foi realizado um esfregaço e corado com uma solução de rosa bengala, *fast-green* e citrato de sódio, conforme Pope (1991), para análise morfológica dos espermatozoides e de integridade acrossomal, foram avaliadas 200 células sendo considerado íntegro o acrossoma corado em azul-arroxeadado, e lesado quando a região acrossomal apresentava-se rosa ou com apenas alguns pontos azul-arroxeados.

3 - Processamento do sêmen, teste de diluentes e curvas de congelamento.

Somente foram processadas para o teste de criopreservação em um ou mais protocolos, as amostras que atingiram o número mínimo de 2×10^6 espermatozoides móveis/ejaculado e um mínimo de 50% de motilidade progressiva no ejaculado *in natura*.

Após a retirada das alíquotas destinadas à análise, o sêmen residual era processado por quatro métodos, em igual divisão das alíquotas. O sêmen era diluído em meio *Modified HTF Medium with Gentamicin – Hepes* (Irvine Scientific, Santa Ana,

Ca, EUA) (HTF-Hepes) na proporção de 1:1, dividido em micro tubos plásticos (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) e centrifugado a 300G por 10 minutos, quando então era retirado o sobrenadante para remoção do plasma seminal. Os *pellets* residuais eram então diluídos com os criopreservantes utilizando os dois diluentes comerciais com composição descritos na Tabela 2, para teste dos protocolos.

Tabela 2- Componentes dos diluentes comerciais utilizados no experimento.

Componentes do diluente AND	Componentes do diluente TYB
Fosfolipídios	TES 176 mM
TRIS	Tris 80 mM
Ácido cítrico	Dextrose 9 mM
Açúcar	Sulfato de gentamicina 10 mg/mL
Antioxidantes	Glicerol 6% (final)
Solução tampão	Gema de ovo SPF (“ <i>specific pathogen free</i> ”) inativada pelo calor
Glicerol	20%
Água de extrema pureza	
Coquetel de antibióticos	

Obs. As quantidades de ingredientes do diluente MED não são fornecidas pelo fabricante.

Todas as doses foram envasadas com uma concentração mínima de $0,5 \times 10^6$ espermatozoides/dose, em palhetas de 0,25ml. Foram testados dois diluentes e duas curvas de criopreservação, combinadas entre si:

- a) *Diluente TYB- Test Yolk Buffer®* (Irvine Scientific, Santa Ana, Ca, EUA) em duas frações: *Refrigeration medium* (TYB-r) e *Freezing medium* (TYB-f), com indicação original para humanos. O *pellet* foi diluído em 50% TYB-r, posteriormente foi adicionado à alíquota 25% da fração TYB-f e em um intervalo de 10 minutos sofreu nova adição de 25% da fração TYB-f, completando a alíquota, ficando com 6% de glicerol, osmolaridade $280\text{--}320\text{mOsmkg}^{-1}$ e com gema de ovo em sua composição.
- b) *Diluente MED - AndroMed® CSS single step* (Minitub, Tiefenbach, Alemanha) – com indicação original para bovinos. O meio extensor foi diluído em água

bidestilada na proporção de 4:1, ficando com 6% de glicerol, com osmolaridade média de 289 mOsmkg⁻¹ e sem gema de ovo ao ser adicionado ao *pellet*.

c) *Curva TK* - As palhetas após o envase foram acondicionadas na máquina de congelamento (*TK 3000*®, TK Equipamentos para Reprodução, Uberaba, MG, Brasil). O mesmo foi programado na curva para caprinos, para resfriar as palhetas de 20°C até 5°C em uma hora, em uma taxa de resfriamento de 0,25°C/min e, ao atingir esta temperatura, a coluna metálica do equipamento permanecia por mais uma hora e meia na temperatura de 5°C, para equilíbrio. Na sequência, o cilindro metálico, onde estavam alojadas as amostras, era mergulhado em 5 cm de nitrogênio líquido e iniciava-se o processo de congelamento programado, a uma taxa de -20°C/min até atingir a temperatura de -120°C, quando então as palhetas eram mergulhadas em nitrogênio líquido, completando a etapa de congelamento.

d) *Curva GEL* - As palhetas após o envase foram colocadas em um pequeno saco plástico e imersas na água em um frasco *Becker* com 300 ml de água a 20°C. Este recipiente foi colocado em refrigerador a 5°C, durante três horas para resfriamento e equilíbrio. Após o equilíbrio, as amostras foram transferidas para caixa de isopor (18 x 15 x 22 cm) em um suporte metálico e mantidas por dois minutos em vapor de nitrogênio a 8,0 cm da coluna líquida e mais dois minutos a 3,0 cm da coluna líquida de nitrogênio, para então serem mergulhadas em nitrogênio líquido, completando a etapa de congelamento.

O descongelamento do sêmen foi realizado após 30 dias ou tempo superior, mergulhando as palhetas durante 30s em água aquecida a 37°C, com análises subsequente. O sêmen descongelado foi mantido em recipiente mergulhado em água aquecida a 37°C por até 2 horas para análises de viabilidade espermática.

4 – Análises

4.1 Índice de motilidade espermática

Realizado com o sêmen fresco, com o sêmen após diluição em meio extensor, com o sêmen recém-descongelado, com uma hora após descongelamento e com duas horas após descongelamento.

Foram retirados 5 µl da amostra para análise em microscópio ótico (100x) quanto à motilidade (0 a 100%) e vigor espermático (0 a 5) e com os dados de motilidade e vigor foi calculado o IME com a fórmula apresentada anteriormente.

4.2 - Análise de integridade de acrossoma.

Foram realizados dois testes para avaliação de integridade acrossomal. Nos momentos antes e após descongelamento com corante de Pope (1991) e após descongelamento com sondas fluorescentes, conforme método descrito anteriormente.

Com as sondas fluorescentes Iodeto de Propídio (IP) e *Lectin from Arachis hypogaea FITC Conjugate* (20 mg/mL), a avaliação da integridade do acrossoma foi baseada na técnica descrita por Tabuchi *et al.* (2008), com modificações. As lâminas foram avaliadas sob aumento de 1000x, em microscópio de epifluorescência (Olympus BX 51, América INC, São Paulo - Brasil), através de excitação em filtro1 (WU com excitações de 450-490 nm, e emissão 520 nm). Após a contagem de 100 espermatozoides por lâmina, foram consideradas células com acrossoma íntegro aquelas que apresentavam fluorescência verde no acrossoma. Quando a cabeça da célula estava corada de vermelho (indicativa de acúmulo de IP) e a coloração verde não aparente, o acrossoma foi considerado danificado, ver figura 1A

4.3 – Avaliação de integridade de membrana espermática.

A avaliação da integridade da membrana espermática foi realizada no sêmen descongelado e é considerada indicativa da viabilidade da célula espermática. Foi realizada através das sondas fluorescentes Diacetato de Carboxifluoresceína (CFDA) e Iodeto de Propídio (IP), conforme descrito por Harrison & Vickers (1990). A avaliação foi realizada com aumento de 400x, em microscópio de epifluorescência (Olympus BX 51, América INC, São Paulo - Brasil), com o filtro 1 (WU com excitações de 450-490 nm e emissão de 516 (CFDA) e 617 nm (IP)), com a sala escura, contando 100 espermatozoides por lâmina. As células espermáticas apresentando fluorescência verde foram consideradas íntegras, enquanto as células espermáticas apresentando fluorescência vermelha foram consideradas danificadas, ver figura 1B.

4.4 – Atividade mitocondrial.

A avaliação da atividade mitocondrial foi realizada com o sêmen descongelado, utilizando-se a técnica descrita por Evenson *et al.* (1982), com os corantes Rodamina 123 (0,2 mM) (R8004, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA) e Iodeto de Propídio (IP) (73 µM) (P4170, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA). A avaliação foi realizada com aumento de 400x, em microscópio de epifluorescência (Olympus BX 51, América INC, São Paulo - Brasil), com o filtro 1 (WU com excitações de 450-490 nm e emissão de 516 (CFDA) e 617 nm (IP)), com a sala escura. Foram contadas 100 células por lâmina. As células que apresentavam a peça intermediária com uma intensa fluorescência verde foram consideradas com mitocôndrias íntegras e funcionalmente ativas, enquanto as células sem intensa fluorescência verde na peça intermediária foram consideradas não funcionais, ver figura 1C.

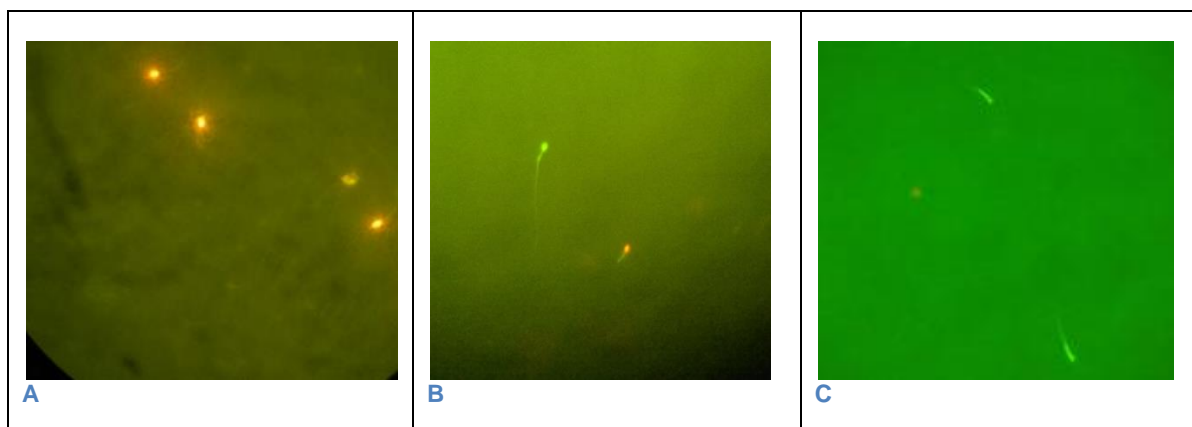


Figura 1 –Espermatozoides analisados por sondas fluorescentes. (A) Avaliação de integridade de acrossoma; cabeça da célula corada de vermelho, o acrossoma foi considerado danificado. (B) Avaliação de integridade de membrana espermática; células espermáticas apresentando fluorescência verde foram consideradas íntegras, células espermáticas apresentando fluorescência vermelha foram consideradas danificadas.(C) Avaliação de atividade mitocondrial; células que apresentavam a peça intermediária com uma intensa fluorescência verde foram consideradas com mitocôndrias íntegras.

5 –Estatística.

Para os resultados numéricos foram apresentados a média e o erro padrão da média. Nos dados com possibilidade de correlação, foi realizado o teste não paramétrico de Spearman, considerando como correlação moderada valores positivos e negativos entre 0,5 e 0,69 e forte entre 0,7 e 1. Foi realizada comparação de motilidade, vigor e IME, nos diferentes tempos do experimento. No sêmen descongelado foi comparada a integridade de membrana, atividade mitocondrial e integridade acrossomal entre os protocolos. Foi realizado o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificação se os dados apresentavam distribuição normal e aplicado o teste One-way ANOVA com pós-teste de Tukey e para dados que não se encaixaram na distribuição normal foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn para múltiplas comparações. Para testes de duas médias foi aplicado o teste não paramétrico de Mann-Whitney. O nível de confiança adotado em todos os

testes foi de 95% ($\alpha=0,05$). Os dados foram analisados com o *software* InStat-3 (GraphPad Software, Inc., EUA).

Resultados

As avaliações clínicas dos animais demonstraram indivíduos com bom escore corporal e ausência de ectoparasitos. Foram detectadas em quatro animais (1883, 2333, 1851 e 1495) lesão dermatológica por lambedura e retirada forçada de pelos. Valores hematológicos e bioquímicos apresentaram-se dentro da normalidade (Correa, 1999).

Nas avaliações morfológicas do aparelho genital, foram encontrados pênis de aspecto normal, com inserção posterior, ausência de espículas penianas em todos os indivíduos e sem aderências ou frênulo persistente.

Houve coleta de sêmen em todos os procedimentos de eletroejaculação realizados, sendo observado em todos os procedimento ereção peniana e ejaculação dos animais, entretanto, algumas amostras (n=4) do animal 1883 e todas as amostras (n=5) do animal 1851 apresentaram-se azoospérmicas.

Foi registrado o nascimento de apenas um filhote entre os cinco pareamentos, sendo este, a partir do acasalamento do macho 1495 com a fêmea 2099. Os parâmetros reprodutivos basais (Tabela 3 e 4), onde se observa variação ($p<0,05$) entre indivíduos para peso, volume de sêmen, concentração dos espermatozoides nas amostras e número de espermatozoides viáveis produzidos, mas não foram observadas diferenças, com significância estatística ($p>0,05$), entre os períodos pré e pós-pareamento nas variáveis pesquisadas.

Tabela 3 –Parâmetros andrológicos de coletas de sêmen (n=30) de *L. wiedii* (n=6) e níveis de andrógenos das amostras fecais (n=94).

Parâmetros	Média	Dif. entre animais	Pré pareamento***	Pós pareamento***	Dif. entre períodos
Peso dos animais (Kg)	3,90 ± 0,15	* p = 0,0001	3,96 ± 0,20	3,80 ± 0,23	p=0,573
Volume sêmen (ml)	309,00 ± 34,96	* p = 0,008	242,73 ± 46,66	368,00 ± 70,08	p=0,134
Concentração (x10 ⁶ ml ⁻¹)	45,07 ± 12,26	* p = 0,010	53,00 ± 22,68	37,7 ± 12,77	P=0,977
Espermatozoides viáveis (x10 ⁶ ml ⁻¹)	8,44 ± 1,95	*p = 0,024	5,88 ± 2,11	9,63 ± 3,98	p=0,469
Índice de motilidade espermática **	73,72 ± 3,19	p = 0,113	74,68 ± 4,29	71,78 ± 2,76	p=0,562
Espermatozoides normais (%) **	53,71 ± 3,79	p = 0,115	53,63 ± 3,30	54,17 ± 7,47	p=0,572
Acrossoma integro (%) **	98,03 ± 0,14	p=0,314	97,94 ± 0,17	98,15 ± 0,24	p=0,633
Andrógenos fecais (ng/g)	51,57 ± 4,98	p=0,133	54,19 ± 7,17	47,17 ± 5,90	p=0,995

*Encontrado diferença estatística entre os animais (P<0,05).

** excluído animal 1851 azoospermico em todas as coletas.

*** excluído animal 1801 das médias pré e pós-pareamento, por não ter sido pareado.

Tabela 4 – Morfologia espermática das amostras de sêmen (n=30) de gatos-maracajá (n=6).

Morfologias espermáticas no sêmen fresco	% de alterações (±EPM)
Normais	53,71 ± 3,79
Alterações de cabeça	7,41 ± 0,50
Alterações de peça intermediária	12,47 ± 0,90
Alterações de cauda	25,76 ± 0,70
Outros	0,65 ± 0,30

A produção média de andrógenos mensuráveis não apresentou diferença significativa entre animais (p=0,133), mesmo para o animal (1851), azoospermico em todas as coletas (Tabela 3) ou após período de pareamento (p=0,995) entre casais (Figura 2). Foi identificada uma grande amplitude na produção de andrógenos com mensurações entre 15,5 ng/g de fezes a 203 ng/g de fezes e coeficientes de variação (CV) entre 70,22% a 98,24% nas amostras individuais.

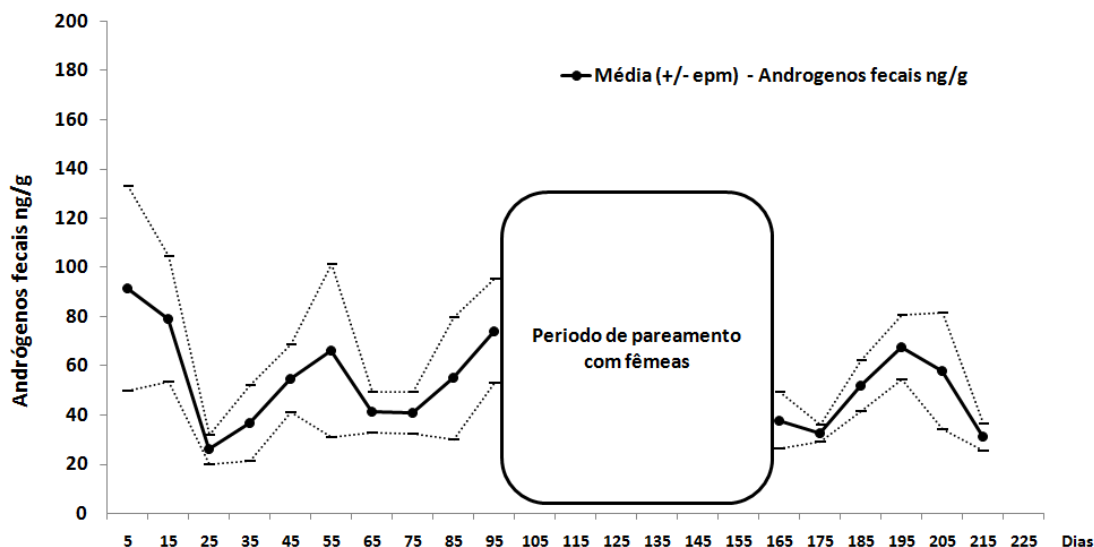


Figura 2. Média de andrógenos fecais nos períodos pré e pós-pareamento de gatos-maracajás machos (n=5) que foram pareados com fêmeas.

Houve um aumento na produção de espermatozoides viáveis na primeira coleta de sêmen após o pareamento (Figura 3), mas o mesmo não foi suficiente para caracterizar diferença significativa ($p=0,360$).

Não foi identificada correlação entre os níveis médios de andrógenos fecais e a produção de espermatozoides viáveis nestes machos de *L. wiedii* ($r=-0,657$ e $p=0,175$).

Os protocolos de criopreservação espermática testados nos machos de *L. wiedii* apresentaram resultados favoráveis para o diluente TYB - *Test Yolk Buffer*® (Irvine Scientific, Santa Ana, Ca, EUA) comparados os IME do sêmen após diluição ao meio ($p=0,005$), após descongelamento em zero hora ($p=0,0004$), uma hora ($p=0,002$) e duas horas após descongelamento ($p=0,0002$), e melhor resultado associado à curva TK ($p=0,0002$), quando avaliados no tempo de termo-resistência (Figura 4). Ainda foi o melhor resultado ($p=0,0001$) considerando a atividade mitocondrial do sêmen descongelado, embora, com resultados similares nos testes de integridade de membrana ($p=0,288$) e integridade de acrossoma ($p=0,142$) com os demais protocolos (Figura 5).

A Tabela 5 identifica a diferença nos resultados de IME do sêmen descongelado ($p=0,0005$), mas não no sêmen fresco ($p=0,113$) quando comparados entre os machos ($n=5$) de *L. wiedii*, considerando todos os protocolos testados e excluindo o animal (1851) que foi azoospermico em todas as coletas.

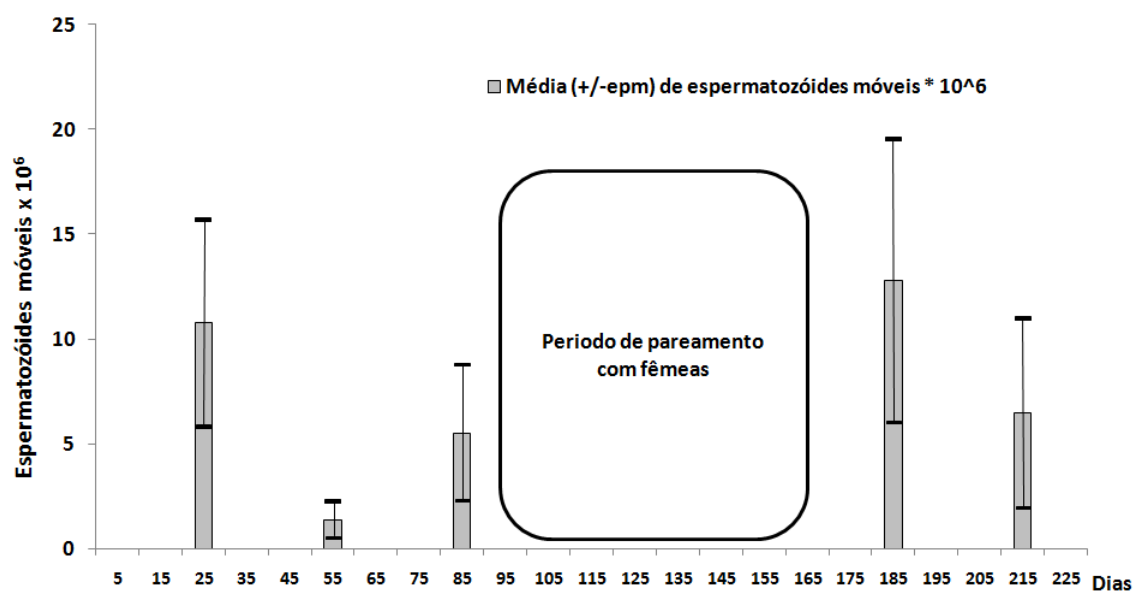


Figura 3 – Média de espermatozoides viáveis de sêmen coletado em cinco gatos maracajá, sem diferença estatística entre as coletas ($p>0,05$).

Tabela 5 – Dados reprodutivos individuais de gatos-maracajá e resultados de criopreservação.

Animal	Andrógenos fecais (ng/g)	Espermatozoides viáveis. (*10 ⁶ ml ⁻¹) – Sêmen fresco	IME – Sêmen fresco	IME – Sêmen descongelado
2333	37,20 (± 9,76) a	9,32 (± 4,77) ab	78,75 (± 3,88) a	14,58 (± 4,15) ab
1495	54,32 (± 11,97) a	8,88 (± 4,01) ab	62,00 (± 1,83) a	7,62 (± 3,16) b
1883	72,85 (± 13,67) a	5,28 (± 5,28) ab	77,50 (± 0,00) a	42,5 (± 5,95) a
1851	48,21 (± 10,12) a	0,00 (± 0,00) b		
2409	45,85 (± 8,80) a	13,44 (± 5,50) a	79,50 (± 2,89) a	14,87 (± 4,00) ab
1801	42,30 (± 5,12) a	13,72 (± 5,93) a	75,66 (±16,89) a	35,45(± 6,48) a

Valor de p entre animais	0,173	0,046	0,113	0,0005
--------------------------	-------	-------	-------	--------

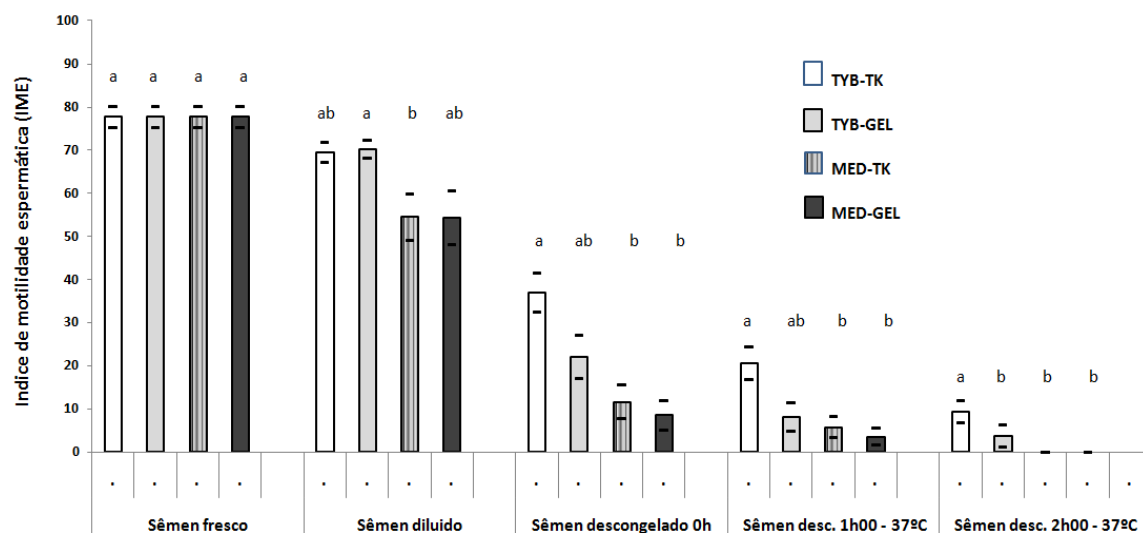


Figura 4 – Índice de motilidade espermática nas etapas de criopreservação seminal, com os diferentes protocolos testados. Letras diferentes na série indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

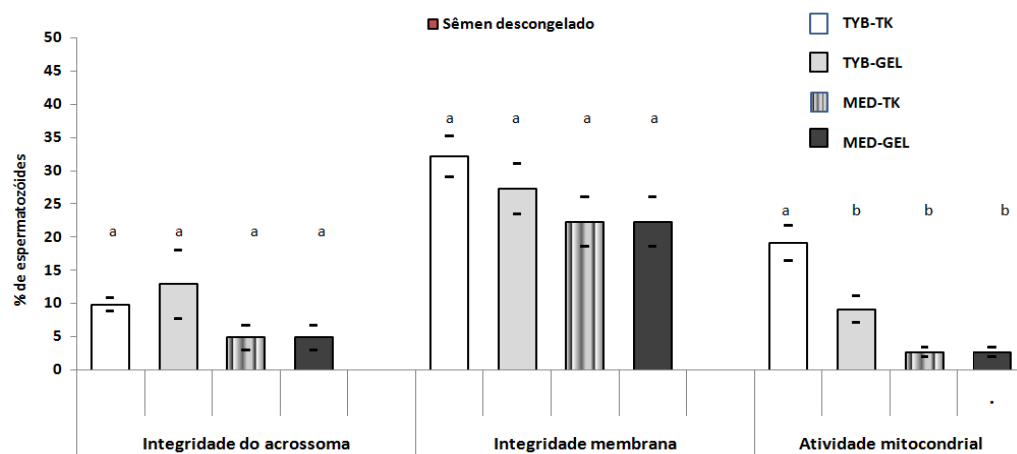


Figura 5 – Resultados de avaliações de integridade acrossômica, integridade de membrana e atividade mitocondrial no sêmen descongelado, nos diferentes protocolos testados. Letras diferentes na série indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

Discussão

Os machos de *L. wiedii* deste trabalho apresentaram uma baixa qualidade seminal, com uma produção de espermatozoides viáveis média de $8,44 \pm 1,95$ ($\cdot 10^6$ ml⁻¹) por coleta com IME $73,72 \pm 3,19$, estando estes dados abaixo de outras espécies do mesmo gênero: *L. tigrinus* com $64,76 \pm 13,96$ ($\cdot 10^6$ ml⁻¹) e IME $80,27 \pm 0,75$ (vide capítulo 3) e de *L. pardalis* com $212,59 \pm 34,63$ ($\cdot 10^6$ ml⁻¹) espermatozoides viáveis e IME $74,84 \pm 1,45$ (vide capítulo 2), todos os animais submetidos ao mesmo padrão de manejo cativo e nutricional. Estes valores são similares aos encontrados por Swanson *et al.* (2003) com $6,4 \pm 2,8$ ($\cdot 10^6$ ml⁻¹) espermatozoides e IME $62,8 \pm 5,3$ em animais (n=27) desta espécie. Com a baixa da quantidade de células viáveis encontradas, optou-se por realizar testes de criopreservação seminal com 0,5 a $4 \cdot 10^6$ ml⁻¹ células viáveis por dose inseminante testada, quantidades abaixo do padrão de IA intrauterina (SWANSON, 2012; STOPS *et al.* 2007; TSUTSUI *et al.*, 2011) mas adequado para IA intra-oviductal ou fertilização *in vitro* (SWANSON, 2012; CONFORTI *et al.*, 2011).

Lesões por lambedura e retirada forçada de pelos em felídeos também foram relatadas por Oliveira *et al.* (2001) e Erdmann (2005), relacionadas entre alguns dos distúrbios mais comuns de felídeos em cativeiro. Neste trabalho os animais 1883 e 1851 que apresentaram estas lesões apresentaram os menores índices de produção espermática, mas os outros animais 2333 e 1495 que também manifestaram este comportamento, mantiveram uma produção constante de sêmen, não sendo possível correlacionar este distúrbio com as baixas qualidades seminais.

Uma reduzida eficiência reprodutiva foi observada no programa de pareamento proposto, com apenas 20% (1/5) de índice de fêmea gestante no acasalamento por monta natural. O período do pareamento dos casais foi restrito ao tempo da possível gestação de 81 a 84 dias (PAZ, 2012), para evitar o nascimento de filhotes com o

macho presente no recinto. O nascimento do único filhote, oriundo do acasalamento (1495 x 2099) foi observado com 103 dias após o início do pareamento e se considerar o período de gestação da fêmea de *L. wiedii*, a concepção ocorreu nas primeiras semanas de pareamento. Não é possível determinar se este índice de fertilidade é decorrente da baixa qualidade seminal dos machos, ambientação de cativeiro, agentes estressantes aos animais ou outro fator. Historicamente, fêmeas de pequenos felídeos neotropicais em cativeiro não têm se reproduzido adequadamente (MOREIRA, 2001). Moreira *et al.* (2007) apontaram que fêmeas de *L. wiedii* mantiveram níveis elevados de corticoides fecais, mesmo após período de enriquecimento ambiental de recinto e que recintos com tamanho adequado são necessários para que os animais expressem seu padrão comportamental, diminuindo o estresse dos indivíduos.

Machos alojados sozinhos ou com fêmeas da espécie produziam maiores números de espermatozoides que machos alojados com outros machos ou outras espécies (SWANSON *et al.*, 2003), fato que foi seguido nesta proposta de reprodução, mantendo machos isolados nos recintos e somente pareando pelo período necessário. Embora não tenha sido coletado sêmen no período de pareamento, foi identificado graficamente que houve um aumento na produção espermática do grupo logo após este período e que um animal (1883) azoospérmico nas primeiras coletas, apresentou produção espermática após o pareamento, mas este incremento na qualidade, ainda não chegou a caracterizar diferença estatística no grupo ($p=0,360$). Também não houve alteração ($p=0,469$) na produção de andrógenos fecais no período pós pareamento, indicando que o padrão de alojamento e manejo não interferiu na produção de andrógenos.

Fêmeas de *L. wiedii* apresentam ovulação espontânea sem a presença de machos e não apresentaram evidências de sazonalidade reprodutiva, portanto, tentativas de reprodução podem ser conduzidas durante o ano todo, embora tenha sido evidenciada uma maior concentração média de progestágenos durante a primavera, indicando maior número de ovulações (MOREIRA, 2001). Morais *et al.* (2002) relataram que não encontraram alterações na produção de andrógenos em *L. wiedii* ao longo do ano, com produção espermática em todos os períodos e um incremento da produção no verão, indicando que esta espécie pode reproduzir sem sazonalidade, quando alocados em regiões de ocorrência da espécie. Swanson *et al.* (2003) também descartaram a sazonalidade como empecilho reprodutivo em pequenos felídeos sul-americanos, caracterizando a dieta e o padrão de alojamento como fatores mais impactantes no sucesso reprodutivo. Morato *et al.* (2004) também não encontraram sazonalidade reprodutiva ou na produção de na *Panthera onca*.

Neste trabalho todos os animais avaliados apresentaram um percentual alto de defeitos espermáticos com índices variando entre 35 a 55 % dos espermatozoides do ejaculado. *L. wiedii* apresentam alto número de defeitos primários espermáticos, indicando problemas na espermatogênese (MORAIS *et al.*, 2002). A dieta pobre é relatada como causa de baixa qualidade espermática, entretanto, os animais deste experimento recebiam dieta de qualidade com suplementação vitamínica e mineral. Morais *et al.* (2002) também reportaram alto índice de defeitos espermáticos (42.8%) em *L. wiedii* mesmo com dieta adequada. Foram encontradas 20,85% de alterações espermáticas em *L. pardalis* e 33.63% de alterações espermáticas em *L. tigrinus* (Ver capítulo 2 e 3), com indivíduos recebendo o mesmo manejo e nutrição dos animais deste experimento. Swanson *et al.* (2003) encontraram um número maior ainda de

alterações espermáticas em *L. wiedii* (60,50%, n=27) alojados em zoológicos da América Latina.

Morais et al. (2002) não encontraram correlação entre percentual de defeitos morfológicos espermáticos ou no número de espermatozoides viáveis por ejaculado em relação às concentrações de andrógenos fecais, quando comparados no mesmo mês, entretanto, encontraram correlação de qualidade seminal quando comparado com os níveis de andrógenos fecais de dois últimos meses, sugerindo que há uma melhora seminal com incremento na produção de andrógenos. Determinar atividade endócrina testicular em mamíferos machos é um passo importante na avaliação da atividade reprodutora masculina quanto à função e fertilidade. A secreção da testosterona, o principal andrógeno secretado pelos testículos, é altamente pulsátil, assim, as concentrações de testosterona circulantes podem variar acentuadamente em questão de horas ou mesmo minutos, tornando a interpretação da condição endócrina com base em amostras em simples, ou não seriada, inadequada, por isso a análise a partir de matrizes biológicas como fezes, que concentram os metabólitos de andrógenos, podem apresentar resultados mais confiáveis (HODGES *et al.*, 2010).

A espermatogênese de *Felis catus* dura 46 dias (FRANÇA; GODINHO, 2003) em felídeos do gênero *Leopardus* dura entre 41 dias em *L. tigrinus* (BALARINI *et al.*, 2012) e 56 dias em *L. pardalis* (SILVA *et al.*, 2010) e não se conhece informações de ciclo seminífero de outras espécies deste gênero, mas assume-se que o período de espermatogênese do *L. wiedii* esteja próximo aos relatados. Considerando estas informações as mensurações de andrógenos fecais devem levar em conta períodos maiores de 30 dias para se estabelecer correlações com a qualidade seminal, mesmo assim não se evidenciou correlações ($r = -0,100$; $p = 0,950$) entre produção de

andrógenos fecais e qualidade seminal, considerando um período de até 45 dias anterior às coletas de sêmen.

Neste trabalho, para dosagem de andrógenos fecais foi utilizada a dosagem de testosterona por quimioluminescência (CLIA) após extração de andrógenos fecais em amostras de fezes úmidas de *L. wiedii*. Esta detecção se mostrou eficaz em teste desafio com GnRH em *L. wiedii*, onde foi caracterizada a capacidade de identificação de variações de metabólitos de testosterona nas fezes destes animais (vide capítulo 4). Este teste apresentou alta correlação ($r=0,9299$; $p<0,0001$) com o teste de enzimoimunoensaio para os mesmos animais. A CLIA demonstrou ser um teste com sensibilidade, custo acessível e facilidade de execução, embora dependa de equipamento específico.

A criopreservação de sêmen é um método utilizado para incremento da reprodução através de técnicas assistidas e para preservação de recursos genéticos. O método se justifica principalmente em espécies de valor comercial, com dificuldades de reprodução *ex situ* e para os programas *in situ* e *ex situ* de conservação das espécies de felinos ameaçadas de extinção, com a finalidade de se obter mais filhotes de pais selecionados, assim, garantindo a variabilidade genética (VILLAVERDE & LOPES, 2007).

Estudos indicam que para uma recuperação de viabilidade espermática satisfatória no pós-descongelamento devem ser levados em considerações os seguintes fatores: A permeabilidade da membrana à água e ao crioprotetor; a toxicidade do crioprotetor; a tolerância a mudanças osmóticas; a resistência às temperaturas de refrigeração e congelação, que em última análise determina a capacidade das células sobreviverem ao congelamento – descongelamento (ZAMBELLI *et al.* 2010; COMIZZOLI *et al.* 2012). Diante destas assertivas as

avaliações de integridade de membrana plasmática, acrossoma, atividade mitocondrial e motilidades da célula espermática foram realizadas para caracterizar a capacidade de sobrevivência e fertilização do sêmen pós-descongelado entre os diferentes tratamentos, onde foram observadas as diferenças ($P < 0.05$) entre as curvas de congelamentos e dos meios de criopreservação em vários testes. O uso de sondas fluorescentes é relatada como método preditivo da integridade do espermatozoide e pode ser utilizada individualmente ou em combinações para avaliação de sêmen de felídeos (PARTYKA *et al.*, 2012; GARAY, 2012; STOOPS *et al.*, 2007; JIMENÉZ *et al.*, 2013; MAGALHÃES *et al.*, 2012), sendo considerado um método objetivo de análise.

Uma curva de resfriamento e congelamento mais lenta é sugerida por Zambeli *et al.* (2002) para melhores resultados na criopreservação seminal de felídeos domésticos. Todos os achados sugerem que uma baixa taxa de resfriamento é um primeiro passo para garantir a preservação da integridade acrossomal em espermatozoides de felinos (PUKAZHENTHI *et al.* 1999), embora, neste trabalho o dano acrossomal não diferiu entre os tratamentos ($p > 0,05$), a avaliação da atividade mitocondrial e o IME do sêmen descongelado demonstraram que a curva de congelamento TK controlada por equipamento automatizado e com taxas de resfriamento de $-0,25^{\circ}\text{C}/\text{min}$ apresentou melhores resultados ($p < 0,0001$ e $p = 0,0004$ respectivamente). A redução de motilidade de espermatozoides também pode ser por uma alteração da disponibilidade de energia ou de uma lesão nos elementos flagelares. Além disso, tem-se observado que as alterações na ultraestrutura das mitocôndrias ocorrem na criopreservação seminal e são seguidos por uma perda da estrutura interna mitocondrial durante o processo. A Rodamina 123 (R123) é o corante

que é usado para corar seletivamente mitocôndrias funcionais. (PARTYKA *et al.*, 2012)

A curva GEL com adaptações, já foi relatada em outras espécies (CROSIER *et al.* 2009 em *Acinonyx jubatus*; GAÑÁN *et al.* 2009 em *Lynx rufus*) com resultados positivos, mas apresentou resultados inferiores neste trabalho quando comparada com uma curva mais lenta (TK) realizada com equipamento automatizado.

O resultado das análises da criopreservação de sêmen em *L. wiedii*, considerando o melhor protocolo, apresentou apenas 26% de espermatozoides com motilidade progressiva e vigor médio de 2,4 (0 a 5), com IME 37 e apenas 9,87 % de acrossomas íntegros, muito abaixo de outro relato utilizando o mesmo protocolo em *L. tigrinus* com 50% de espermatozoides com motilidade progressiva e vigor médio de 2.6 (0-5), com IME 51 e 53.9 % de acrossomas íntegros (vide capítulo 3).

Considerando que gatos domésticos teratospérmicos tendem a sofrer mais danos acrossomais no processo de resfriamento de sêmen que gatos normospérmicos e que os danos de membrana plasmática e acrossoma são os maiores responsáveis pela diminuição da capacidade de fertilização do sêmen descongelado de felídeos (PUKAZHENTHI *et al.* 1999), podemos inferir que o índice de alterações morfológicas espermáticas e a baixa qualidade do sêmen dos *L. wiedii* impactam nos resultados de criopreservação e reprodução, necessitando de maiores estudos na área reprodutiva.

Conclusões

- 1- Machos de *L. wiedii* cativos apresentaram baixa produção espermática com alto índice de defeitos espermáticos.

- 2- O pareamento de casais de gatos-maracajá cativos apresentou baixa eficiência reprodutiva.
- 3- Machos de gato-maracajá não apresentaram diferenças na produção de andrógenos fecais antes e após pareamento com fêmeas.
- 4- O pareamento com fêmeas melhorou a produção espermática de pelo menos um macho, caracterizado inicialmente com azoospermico inicialmente.
- 5- O teste de protocolos para criopreservação de sêmen de *L. wiedii* apresentou melhores resultados com o diluente *Test Yolk Buffer®* (Irvine Scientific, Santa Ana, Ca, EUA) associado à curva com taxa de resfriamento de 0,25°C/min e congelação à - 20°C/min. quando avaliados vigor, motilidade do sêmen, sobrevivência espermática e atividade mitocondrial.

Referências

BALARINI, M. K., DE PAULA, T. A. R., MATTA, S. L., PEIXOTO, J. V., GUIÃO-LEITE, F. L., JÚNIOR, J. L., & WALKER, N. J. Stages and duration of the cycle of the seminiferous epithelium in oncilla (*Leopardus tigrinus* Schreber, 1775). **Theriogenology**, v. 77, n.5, p.873-880, 2012.

BROUSSET, D.M., **Efecto del enriquecimiento ambiental sobre el bienestar de tres especies de felinos Mexicanos en peligro de extinción (ocelote, margay y jaguarundi) mantenidos en cautiverio**. Tesis Doctora en Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF. 2003.

BROWN, Janine L. Comparative endocrinology of domestic and nondomestic felids. **Theriogenology**, v. 66, n. 1, p. 25-36, 2006.

COMIZZOLI, P., SONGSASEN, N., HAGEDORN, M., & WILDT, D. E. Comparative cryobiological traits and requirements for gametes and gonadal tissues collected from wildlife species. **Theriogenology**, v.78, n.8, p.1666-1681. 2012.

CONFORTI, V.A., BATEMAN, H.L., VICK, M.M., LYONS, L.A., GRAHN, R.A., DEDDENS, A., SWANSON, W.F. Improved fertilization success using laparoscopic oviductal artificial insemination with low sperm numbers in domestic cats. **Proc Soc Study Reprod**, 40 pp. 2011.

CORREA, L.C.S. In: **Laboratório ambiental**. Ed. EDUNIOESTE, p.323, Cascavel-PR, 1999.

CROSIER, A.E.; HENGHALI, J.N.; HOWARD, J.G.; PUKAZHENTHI B.S.; TERRELL K.A.; MARKER L.L.; WILDTD.E. Improved quality of cryopreserved cheetah (*Acinonyx jubatus*) spermatozoa after centrifugation through Accudenz. **J. Androl**; v.30, p.298-308; 2009.

ERDMANN, R. H. **Exame reprodutivo, contenção farmacológica e criopreservação de sêmen em gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus* Schreber, 1775)**. Dissertação de Mestrado. UFPR. 2005.

EVENSON, D. P., DARZYNKIEWICZ, Z., & MELAMED, M. R. Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v.30 n.3, p.279-280. 1982.

FRANÇA, L. R; GODINHO, C. L. Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cats (*Felis catus*). **Biol Reprod**,v.68: p.1554-1561, 2003.

GANAN, N., GONZÁLEZ, R., SESTELO, A., GARDE, J. J., SANCHEZ, I., AGUILAR, J. M., & ROLDAN, E. R. S. Male reproductive traits, semen cryopreservation, and heterologous in vitro fertilization in the bobcat (*Lynx rufus*). **Theriogenology**, v.72 n.3, p.341-352. 2009.

GARAY, R.M. **Uso de sondas fluorescentes para avaliação seminal de ejaculado de gato do mato pequeno (*Leopardus tigrinus*) e ensaio de ligação à membrana perivitelina de ovo de galinha (*Gallus gallus*) como ferramenta de predição de fertilidade espermática**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa. 2012.

GENARO, G., MORAES, W., SILVA, J. C. R., ADANIA, C. H., & FRANCI, C. R. Plasma hormones in Neotropical and domestic cats undergoing routine manipulations. **Research in Veterinary Science**, v.82, n.2, p.263-270. 2007.

HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.88, p.343-352, 1990.

HODGES, K.; BROWN, J.; HEISTERMANN, M. Endocrine monitoring of reproduction and stress. **Wild mammals in captivity: principles and techniques for zoo management**, p. 447-468, 2010.

HOWARD, J.G., **Semen collection and analysis in carnivores**. In: Fowler, M.E. (Ed.), *Zoo and Wild Animal Medicine: Current Therapy*, third ed. Saunders, Philadelphia, p. 390–399.1993

IUCN 2013. PAYAN, E., EIZIRIK, E., DE OLIVEIRA, T., LEITE-PITMAN, R., KELLY, M. & VALDERRAMA, C. 2008.*Leopardus wiedii*. In: IUCN 2013. **IUCN Red List of**

Threatened Species. Version 2013.2. <www.iucnredlist.org>. Acessado em 7 Dezembro de 2013.

JEWGENOW, K., NAIDENKO, S. V., GOERITZ, F., VARGAS, A., & DEHNHARD, M. Monitoring testicular activity of male Eurasian (*Lynx lynx*) and Iberian (*Lynx pardinus*) lynx by fecal testosterone metabolite measurement. **General and Comparative Endocrinology**, v. 149, n. 2, p. 151-158, 2006.

JIMENEZ, E; PEREZ-MARIN, C.C.; VIZUETE, G.; MILLAN, Y. AND EI AGUERA. Effect of different extenders on in vitro characteristics of feline epididymal sperm during cryopreservation. **Reproduction in Domestic Animals**. V. 48, n.4,p. 665–672, 2013.

LUVONI, G. C., KALCHSCHMIDT, E., LEONI, S., & RUGGIERO, C. Conservation of feline semen: Part I: Cooling and freezing protocols. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.5, n.4, p.203-208. 2003.

MAGALHÃES, L.C.O., MELO-OÑA, C.M.; SUDANO, M.J.; PASCHOAL, D.M.; CROCOMO, L.F.; ACKERMANN, C.L.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; LOPES, M.D. Preservation of wild feline semen by freeze-drying: experimental model. **Anim Reprod**, v.9, n.3, p.201-204, 2012

MORAIS, R. N. Reproduction in small felid males. In FOWLER M. E. E CUBAS,Z. S. **Biology, Medicine, and Surgery of South American Wild Animals**, p.312. 2008.

MORAIS, R.N.; MUCCIOLO, R.G.; GOMES, M.L.F.; LACERDA, O.; MORAES, W.; MOREIRA, N.; GRAHAM, L.H.; SWANSON, W.F.; BROWN, J.L. Seasonal analysis of semen characteristics, serum testosterone and fecal androgens in the ocelot (*Leopardus pardalis*), margay (*L. wiedii*) and tigrina (*L. tigrinus*). **Theriogenology**, v.57, n.8, p. 2027-2041. 2002.

MORATO, R. G., BUENO, M. G., MALMHEISTER, P., VERRESCHI, I. T. N., & BARNABE, R. C. Changes in the fecal concentrations of cortisol and androgen metabolites in captive male jaguars (*Panthera onca*) in response to stress. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 12, p. 1903-1907, 2004.

MOREIRA, N., BROWN, J. L., MORAES, W., SWANSON, W. F., & MONTEIRO-FILHO, E. L. A. Effect of housing and environmental enrichment on adrenocortical activity, behavior and reproductive cyclicity in the female tigrina (*Leopardus tigrinus*) and margay (*Leopardus wiedii*). **Zoo Biology**, v.26, n.6, p.441-460. 2007.

MOREIRA, N. Reprodução e estresse em felídeos silvestres. **Rev Bras Reprod Anim**, Belo Horizonte, v.31, n.3, p. 333-338, jul./set. 2007.

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

MOREIRA, N., MONTEIRO-FILHO, E. L. A., MORAES, W. D., SWANSON, W. F., GRAHAM, L. H., PASQUALI, O. L., & BROWN, J. L. Reproductive steroid hormones

and ovarian activity in felids of the *Leopardus* genus. **Zoo Biology**, v.20, n.2, p.103-116. 2001.

OLIVEIRA, T. G.; ADANIA, C.H. ; MORAES, W.; GOME, M.; MOREIRA, N.& SILVA, J. ORDER Carnivora, Family Felidae in FOWLER, M. E. & CUBAS. Z. S. **Biology, Medicine, and Surgery of South American Wild Animals** (Vol. 547). Ames: Iowa State University Press. 2001.

PARTYKA, A., NIŻAŃSKI, W. AND OCHOTA, M. **Methods of Assessment of Cryopreserved Semen**, Current Frontiers in Cryobiology, Prof. Igor Katkov (Ed.), 2012. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/current-frontiers-in-cryobiology/methods-of-assessment-of-cryopreserved-semen> acessado em 30/11/2013.

PAZ R. C. R. **Wildlife Cats Reproductive Biotechnology**, Current Frontiers in Cryobiology, Prof. Igor Katkov (Ed.), ISBN: 978-953-51-0191-8, InTech, 2012. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/current-frontiers-in-cryobiology/wildlife-cats-reproductive-biotechnology> acessado em 30/11/2013.

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

PUKAZHENTHI, B., PELICAN, K., WILDT, D., & HOWARD, J. Sensitivity of domestic cat (*Felis catus*) sperm from normospermic versus teratospermic donors to cold-induced acrosomal damage. **Biology of Reproduction**, v.61, n.1, p.135-141.1999.

SCHWARZEMBERGER, F. et al. Concentration of progestagens and oestrogens in the faeces of pregnant Lipizzan, Trotter and Thoroughbred mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 44, p. 489-499, 1991.

SILVA, R. C., COSTA, G. M. J., ANDRADE, L. M., & FRANÇA, L. R. Testis stereology, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in the ocelot (*Leopardus pardalis*). **Theriogenology**. v. 73, p, 157-167, 2010.

STOOPS MA, BOND JB, BATEMAN HL, CAMPBELL MK, LEVELS GP, BROWSHER TR, et al. Comparison of different sperm cryopreservation procedures on post-thaw quality and heterologous in vitro fertilization success in the ocelot (*Leopardus pardalis*). **Reprod Fertil Dev**; v.19, p.685–94. 2007.

SWANSON W.F., MAGAREY G.M., HERRICK J.R. Sperm cryopreservation in endangered felids: developing linkage of in situ-ex situ populations. **Soc Reprod Fertil Suppl**.V.65, p.417-32, 2007.

SWANSON, 2012. Laparoscopic Oviductal Embryo Transfer and Artificial Insemination in Felids – Challenges, Strategies and Successes. **Reprod Dom Anim**. v.47, n. 6, p.136–140. 2012;

SWANSON, W. F., JOHNSON, W. E., CAMBRE, R. C. et al. Reproductive status of endemic felid species in Latin American zoos and implications for ex situ conservation. **Zoo Biol**, vol. 22, p. 421–441, 2003.

SWANSON, W. F.; WILDT, D. E. Strategies and progress in reproductive research involving small cat species. **International Zoo Yearbook**, v. 35, n. 1, p. 152-159, 1997.

TABUCHI, T., SHIDARO, O., HARAYAMA, H. A 32 kDA tyrosine phosphorylated protein shows a protease dependent increase in dead boar spermatozoa. **Journal of Reproduction and Development**, v.54, p.502-507, 2008.

TSUTSUI, T.; MIZUTANI, T.; MATSUBARA, Y.; TOYONAGA, M.; H. OBA and HORI, T.. Surgical Intrauterine Insemination with Cat Semen Cryopreserved with Orvus ES Paste or Sodium Lauryl Sulfate. **J. Vet. Med. Sci.** v.73 n.2, p. 259–262, 2011.

VILLAVERDE, B. A. I. S., & DENISE, M. Inseminação artificial em gatos domésticos utilizando sêmen criopreservado. **Rev Bras Reprod Anim**, Belo Horizonte, v.31, n.1, p.77-83, 2007.

ZAMBELLI, D., CANEPPELE, B., CASTAGNETTI, C., & BELLUZZI, S. Cryopreservation of cat semen in straws: comparison of five different freezing rates. **Reproduction in Domestic Animals**, v.37 n.5, p.310-313.2002.

ZAMBELLI, D., IACONO, E., RACCAGNI, R., & MERLO, B. Quality and fertilizing ability of electroejaculated cat spermatozoa frozen with or without Equex STM Paste. **Theriogenology**, v.73, n.7, p.886-892. 2010.

CONCLUSÃO

Os trabalhos aqui descritos, desenvolvidos com felídeos do gênero *Leopardus*, com a finalidade de padronização de técnicas, ampliação do conhecimento de fisiologia e incremento de resultados em reprodução animal, envolvendo equipamentos, fármacos, insumos e kits diagnósticos, apontaram que:

- 1) A associação de tiletamina-zolazepam e xilazina, nas doses de 7mg/kg e 1mg/kg respectivamente, proporcionou boa qualidade anestésica e segurança para a realização do procedimento de eletroejaculação em jaguatiricas.
- 2) Foi possível criopreservar sêmen de pequenos felídeos neotropicais utilizando criodiluentes comerciais desenvolvido para outras espécies, sendo que o melhor resultado foi obtido com o diluente Test Yolk Buffer® e associado à curva de congelação em equipamento automatizado TK 3000® apresentando resultados semelhantes aos obtidos em outros trabalhos. O equipamento automatizado de congelação seminal apresentou os melhores resultados na motilidade e vigor do sêmen descongelado.
- 3) Existem diferenças individuais na congelabilidade do sêmen, dos machos de felídeos pesquisados, influenciando nos resultados de criopreservação seminal.
- 4) Os kits DRG Testosterone EIA-1559 e DRG Cortisol EIA-1887 foram eficazes para identificar alterações de metabólitos fecais de andrógenos e corticoides, respectivamente, em machos de gato-maracajá, jaguatirica e gato-do-mato-pequeno. Os kits DRG Testosterone EIA-1559 e Access Testosterone assay 33560 possuem boa correlação para mensuração de andrógenos fecais de gatos-maracajá.
- 5) Machos de gatos-maracajá cativos apresentaram baixa produção espermática com alto índice de defeitos espermáticos e o pareamento com fêmeas não foi capaz de alterar níveis de andrógenos fecais ou gerar incremento significativo na produção espermática.