

DAIAM LOYOLA KAMPA BAUDI

**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 apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rosana Nogueira de Moraes

CURITIBA 2005

O homem é o único animal que ainda não aprendeu a respeitar o meio ambiente.

Dedico este trabalho a todos os animais cujas espécies estão ameaçadas de extinção.

Espero que o homem ainda consiga aprender com eles...

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por iluminar o caminho...

À minha Mãe, **Jeny**, pelo amor de mãe, sempre incondicional, e ao **Rogério**, meu grande companheiro de todas as horas, agradeço o apoio financeiro e emocional e, sobretudo a compreensão e o amor.

A minha amiga e orientadora, **Profa. Dra. Rosana Nogueira de Moraes**, que com seu apoio, proficiência e serenidade conduziu-me na superação das dificuldades enfrentadas durante este trabalho. Obrigada pela oportunidade de trabalharmos juntas e nos tornarmos amigas.

Agradecimento especial à grande amiga e colega Médica Veterinária **Katherine Maria Sperscori**, que me auxiliou imensamente a transpor os percalços encontrados e que, a despeito de todas as dificuldades, sempre me incentivou a continuar.

Às colegas de pós-graduação e Médicas Veterinárias **Marilisa Calomeno** e **Graziela Müller** pelo auxílio prestado sempre que necessário.

Aos alunos estagiários (e futuros colegas) **Fabiola, Andrei, Angela e Aline**, agradeço a prestimosa ajuda e dedico agradecimento especial ao **Helber**, pela amizade generosa.

A **Dra. Katarina Jewgenow** pela orientação sobre as práticas laboratoriais que foram fundamentais para a execução do experimento.

A **Profa. Dra. Maria Denise Lopes** pelo estágio informal proporcionado em seu laboratório na UNESP- Campus Botucatu e por seu sincero auxílio sobre os assuntos inquiridos.

Ao Hospital Veterinário da UFPR, em especial ao ex-diretor **Prof. Marcos Vinícius Ferrari**, por permitir a esterilização de gatas domésticas com a finalidade de proporcionar um maior número de ovários para utilização no experimento. Agradeço também ao Médico Veterinário **Rogério Robes**, responsável pela anestesia desses animais.

Ao Hospital Veterinário da PUC-PR, na pessoa do **Prof. Dr. Antonio Felipe P. de Figueiredo Wouk**, por proporcionar a doação dos ovários de gatas domésticas para uso experimental. Agradecimento especial aos Médicos Veterinários desta instituição que realizaram os procedimentos de anestesia e cirurgia.

À **Diretoria do Zoológico de Curitiba-PR**, pela colaboração e confiança depositada em nosso trabalho, em especial aos Médicos Veterinários **Manoel Lucas Javorouski** e **Lucienne Gisele Popp Brasil**, pela valiosa colaboração na colheita das amostras.

À **Fundação Hermann Weege – Zoológico de Pomerode-SC** e seus diretores, por permitirem a colheita de amostras nos animais desta instituição, e ao Médico Veterinário **Marcus Vinícius Cândido**, pela valiosa colaboração na colheita das amostras.

Ao **Criadouro Conservacionista da Indústria Klabin – Telêmaco Borba-PR**, agradeço a seus diretores e técnicos pela liberação dos felinos selvagens para os procedimentos necessários à colheita do sêmen e pelo uso de suas instalações.

À Médica Veterinária **Marúcia de Andrade Cruz**, proprietária da Clínica Mania de Gato, que promoveu campanha de esterilização de gatas domésticas, principalmente pela generosidade em adequar seu cronograma de trabalho às necessidades do experimento.

À Clínica Veterinária Clinivet, na pessoa do Médico Veterinário **César Augusto Ranzani**, e à Médica Veterinária **Elzira Maria Louro**, que gentilmente cederam, para uso experimental, os ovários das gatas domésticas esterelizadas na rotina cirúrgica.

Aos Médicos Veterinários **Paulo Mangini** e **Salviano Tramontin Belettini** pelo auxílio prestado nos procedimentos de anestesia dos felinos selvagens do criadouro da Klabin.

Ao Clube das Pulgas pela pronta disposição em contactar os proprietários cujos animais doaram sêmen e ovários.

Ao IAPAR, na pessoa do técnico **Afonso Gerônimo Pudziak**, que providenciou amostras de sêmen de bovinos para utilização em testes e treinamento de técnicas.

À **Pós-graduação dos Departamentos de Biologia Celular e Fisiologia do Setor de Ciências Biológicas da UFPR**, que permitiu a utilização de suas dependências e equipamentos, garantindo assim a estrutura física para execução do experimento.

Ao **curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias** pelo auxílio financeiro, permitindo a realização da pesquisa, e ao **Prof. Dr. José Luciano Andriguetto**, coordenador deste curso, pelo apoio no caminho trilhado.

A todos os professores e colegas do curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, pelos ensinamentos e pela oportunidade de convívio e amizade. Dedico agradecimento especial ao querido Mestre, **Prof. Dr. Antonio Felipe P. de Figueiredo Wouk** que, desde os ensinamentos da graduação, sempre ofertou uma palavra amiga e de estímulo na busca do objetivo almejado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**), pela bolsa de estudos concedida.

A todos os animais que participaram do experimento, agradeço o auxílio que, apesar de inconsciente e involuntário, foi fundamental para realizar esta pesquisa.

A todos os meus amigos animais que me inspiraram a buscar a realização profissional na Medicina Veterinária.

A todos que contribuíram para a realização e divulgação desta pesquisa.

Quando pensamos que temos todas as respostas

Vem a vida...e muda todas as perguntas  
(autor desconhecido)

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS E FIGURAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS .....	x
LISTA DE UNIDADES .....	x
RESUMO .....	xi
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
2.1 Objetivos Específicos.....	4
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	5
3.1 Biotécnicas reprodutivas em pequenos felinos Sul-Americanos.....	5
3.2 Colheita de sêmen em felinos.....	6
3.3 Avaliação do sêmen.....	7
3.4 Criopreservação do sêmen.....	9
3.5 Ensaios in vitro de avaliação da função espermática .....	12
3.6 Fonte de ovócitos para ensaios in vitro.....	16
3.7 Maturação in vitro dos ovócitos.....	17
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	21
4.1 Animais .....	21
4.2 Protocolo anestésico.....	21
4.3 Colheita do sêmen .....	22
4.4 Avaliação do sêmen fresco .....	23
4.5 Criopreservação do sêmen.....	25
4.6 Descongelamento do sêmen e avaliação pós-descongelamento .....	26
4.7 Coleta dos ovócitos e maturação in vitro .....	27
4.8 Remoção das células do cúmulus .....	29
4.9 Ensaios de ligação espermática competitiva in vitro.....	30
4.10 Avaliação da maturação in vitro.....	31
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
6. RESULTADOS.....	35
6.1 Características do sêmen pré e pós-descongelamento .....	35
6.2 Maturação ovocitária in vitro .....	39
6.3 Ensaios de ligação espermática competitiva in vitro.....	39
7. DISCUSSÃO.....	43
8. CONCLUSÕES.....	54
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

TABELA 1 -	MÉDIA ( $\pm$ EPM) DAS CARACTERÍSTICAS DE SÊMEN DE GATO-DO-MATO-PEQUENO ( <i>Leopardus tigrinus</i> ), JAGUATIRICA ( <i>L. pardalis</i> ) E GATO DOMÉSTICO ( <i>Felis catus</i> ) .....	37
TABELA 2 -	ÍNDICES MÉDIOS ( $\pm$ EPM) DE MOTILIDADE ESPERMÁTICA, ACROSSOMA, MORFOLOGIA E VIABILIDADE DE SÊMEN FRESCO E CRIOPRESERVADO DE GATO-DO-MATO-PEQUENO ( <i>Leopardus tigrinus</i> ), JAGUATIRICA ( <i>Leopardus pardalis</i> ) e GATO DOMÉSTICO ( <i>Felis catus</i> ).....	38
TABELA 3 -	NÚMERO DE OVÓCITOS COLETADOS DE 43 OVÁRIOS DE GATAS DOMÉSTICAS E TAXA DE MATURAÇÃO MÉDIA ( $\pm$ EPM) PARA OVÓCITOS GRAU I E II.....	40
TABELA 4 -	TAXA MÉDIA ( $\pm$ EPM) DE OVÓCITOS LIGADOS E ÍNDICE MÉDIO ( $\pm$ EPM) DA LIGAÇÃO ESPERMÁTICA DE SÊMEN CRIOPRESERVADO DE GATO-DO-MATO-PEQUENO ( <i>L. tigrinus</i> ), JAGUATIRICA ( <i>L. pardalis</i> ) E GATO DOMÉSTICO ( <i>F. catus</i> ) NOS ENSAIOS UTILIZANDO OVÓCITOS DE GATA DOMÉSTICA .....	42
FIGURA 1 -	FOTOMICROGRAFIA DE OVÓCITO DE GATA DOMÉSTICA E ESPERMATOZÓIDES DE JAGUATIRICA EM ENSAIO DE LIGAÇÃO ESPERMÁTICA, CORADOS COM HOECHST. A FLUORESCÊNCIA REFERE-SE AO DNA ESPERMÁTICO - AUMENTO 200 X.....	33
FIGURAS 2 E 3 -	FOTOMICROGRAFIA DE OVÓCITO DE GATA DOMÉSTICA E ESPERMATOZÓIDES DE GATO-DO-MATO-PEQUENO EM ENSAIO DE LIGAÇÃO ESPERMÁTICA, CORADOS COM HOECHST. A FLUORESCÊNCIA REFERE-SE AO DNA ESPERMÁTICO E A SETA INDICA A PENETRAÇÃO DE UM ESPERMATOZÓIDE- AUMENTO 200 X .....	33

- FIGURA 4 - FOTOMICROGRAFIA DE OVÓCITO DE GATA DOMÉSTICA MATURADO *IN VITRO*, CORADO COM HOECHST. AS SETAS INDICAM O FUSO MITÓTICO (METÁFASE II) – AUMENTO 200 X..... 34
- FIGURA 5 - FOTOMICROGRAFIA DE OVÓCITO DE GATA DOMÉSTICA IMATURO, CORADO COM HOECHST. A SETA INDICA A QUEBRA DA VESÍCULA GERMINATIVA - AUMENTO 200 X..... 34
- FIGURA 6 - ÍNDICES MÉDIOS ( $\pm$  EPM) DE MOTILIDADE ESPERMÁTICA E ACROSSOMA DE SÊMEN FRESCO E CRIOPRESERVADO DE GATO-DO-MATO-PEQUENO (*Leopardus tigrinus*), JAGUATIRICA (*L. pardalis*) E GATO DOMÉSTICO (*Felis catus*)..... 39
- FIGURA 7 ÍNDICE MÉDIO ( $\pm$  EPM) DA LIGAÇÃO ESPERMÁTICA DE SÊMEN CRIOPRESERVADO DE GATO-DO-MATO-PEQUENO (*Leopardus tigrinus*), JAGUATIRICA (*L. pardalis*) E GATO DOMÉSTICO (*Felis catus*)..... 43

## LISTA DE ABREVIATURAS

UFPR	-	Universidade Federal do Paraná
PUC-PR	-	Pontifícia Universidade Católica do Paraná
UNESP	-	Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”
IAPAR	-	Instituto Agronômico do Paraná
EPM	-	Erro Padrão da Média
DNA	-	Ácido Desoxirribonucleico
IP	-	Iodeto de Propídio
COCs	-	Complexos Cúmulus-Ovócitos
FSH	-	Hormônio Folículo Estimulante
LH	-	Hormônio Luteinizante
ADH	-	Hormônio Anti-diurético
CO <sub>2</sub>	-	Dióxido de Carbono
min	-	minuto
v:v	-	volume:volume
p:v	-	peso:volume

## LISTA DE UNIDADES

nm	-	nanômetro
µm	-	micrômetro
mm	-	milímetro
cm	-	centímetro
µg	-	micrograma
mg	-	miligrama
g	-	grama
kg	-	quilograma
µl	-	microlitro
ml	-	mililitro
L	-	litro
°C	-	graus centígrados
V	-	volts

## RESUMO

A busca de estratégias eficientes para a manutenção de espécies em risco de extinção tem impulsionado a comunidade científica a pesquisar alternativas para a preservação de material genético, com intuito de formação de bancos de genoma e aplicação de biotécnicas reprodutivas. Este estudo teve por objetivo avaliar os efeitos de dois protocolos diferentes de resfriamento pré-congelamento para a criopreservação de sêmen de jaguatirica (n=3), gato-do-mato-pequeno (n=4) e gato doméstico (n=15). Apenas seis amostras de sêmen de jaguatirica, sete de gato-do-mato-pequeno e treze amostras de gato doméstico apresentaram características qualitativas e quantitativas para serem submetidas aos dois métodos de resfriamento. Estas amostras foram processadas e diluídas em meio crioprotetor, com 4% de glicerol e divididas em duas alíquotas submetidas ao método rápido (30 min a 4°C) ou lento ( $\cong$  2 horas a 4°C) de resfriamento e, em seguida congeladas. Após o descongelamento as amostras foram avaliadas para índice de motilidade, percentual de células com acrossoma intacto e de células viáveis. Ovócitos de gatas domésticas maturados *in vitro* foram utilizados para avaliar a capacidade de ligação espermática à zona pelúcida, em ensaios de ligação competitiva *in vitro*. Os espermatozóides criopreservados pelos dois métodos, diferenciados entre si pelo uso de corante vital, competiram pela ligação à zona pelúcida dos mesmos ovócitos, em iguais condições de tratamento. O índice médio da motilidade espermática, pós-congelamento, foi de aproximadamente 50% para todas as espécies nos dois métodos de resfriamento. O percentual de células com acrossoma intacto, para a jaguatirica, foi de aproximadamente 20% nos dois métodos de resfriamento enquanto o gato-do-mato-pequeno apresentou 30,8% de células com acrossoma intacto no método de resfriamento rápido e 33,4% no método lento. Para o gato doméstico, o percentual de células com acrossoma intacto foi de 33,4% e 32,7% nos métodos de resfriamento rápido e lento, respectivamente. O sêmen do gato-do-mato-pequeno sofreu a menor redução no percentual de células viáveis com 51,2% no método de resfriamento rápido e 44% no método lento. A jaguatirica apresentou os menores índices entre as três espécies com 24% de células viáveis no método rápido e 27,4% no método lento, e o gato doméstico apresentou 28,6% e 28,2% de células viáveis nos métodos rápido e lento, respectivamente. O número médio de espermatozóides ligados por ovócito foi maior ( $p < 0,05$ ) para o resfriamento lento do sêmen de gato-do-mato-pequeno ( $5,8 \pm 0,9$ ) do que para o resfriamento rápido ( $2,7 \pm 0,4$ ). Já o resfriamento rápido proporcionou melhores resultados na taxa de ligação espermática para a jaguatirica ( $8,5 \pm 1,3$ ) ( $p < 0,01$ ) e para gato doméstico ( $4,3 \pm 0,9$ ) ( $p < 0,05$ ), enquanto o método de resfriamento lento proporcionou  $2,5 \pm 0,3$  espermatozóides de jaguatirica e  $1,4 \pm 0,2$  espermatozóides de gato doméstico ligados por ovócito. As diferentes respostas entre as espécies podem ser devidas a características espermáticas espécie-específicas e individuais. Os resultados permitiram inferir que os protocolos de criopreservação devem ainda ser aperfeiçoados e adaptados à cada espécie e que o ensaio de ligação

espermática competitiva foi eficiente na detecção de diferenças na função espermática entre tratamentos, o que não foi possível com as avaliações espermáticas de rotina.

PALAVRAS-CHAVE: congelamento de sêmen, ligação espermática *in vitro*, maturação *in vitro*, resfriamento de sêmen, felinos

## ABSTRACT

The search for efficient strategies to preserve species from extinction has stimulated scientists to develop alternative methods to preserve genetic material with the aim of establishing genome resource bankings and also the improvement of reproductive technologies. This study aimed to evaluate the effects of two different cooling protocols for the cryopreservation of sperm in ocelots (n=3) tigrinas (n=4) and domestic cats (n=15). Only six semen samples from tigrinas, seven from ocelots and thirteen ejaculates from domestic cats were high quality and allowed both cooling methods freezing. These samples were diluted with a 4% glycerol freezing medium, divided into two vials and assorted to one of the cooling rates (30 min at 4°C – fast method or  $\cong$  2 h – slow method) before freezing. After thawing, samples were evaluated for sperm motility, percentage of intact acrosome cells and percentage of viable cells. *In vitro* matured domestic cat oocytes were used to assess the ability of sperm to bind to zonae pellucida in *in vitro* competitive sperm-binding assays. Spermatozoa from one of the treatments were stained with a vital fluorescent stain and sperm from both treatments competed for the same oocytes in equal co-incubation conditions. Sperm motility index after thawing was approximately 50% for all species in both cooling methods. The percentage of acrosome intact cells for ocelots was nearby 20% in both cooling methods while the tigrinas showed 30,8% acrosome intact cells in fast cooling method and 33,4% in slow method. For domestic cats the percentage of cells with acrosome integrity was 33,4% and 32,7% in fast and slow methods, respectively. The percentage of viable cells for tigrinas had the lowest reduction with 51,2% in fast cooling method and 44% in slow method. The ocelots showed the lowest index among three species with 24% of viable cells in fast method and 27,4% in slow method, and the domestic cat showed 28,6% and 28,2% of viable cells in fast and slow cooling methods, respectively. The average number of sperm binded per oocyte was higher ( $p < 0,05$ ) for the slow cooling rate in tigrina semen ( $5.8 \pm 0.9$ ) than fast cooling method ( $2.7 \pm 0.4$ ). The fast cooling treatment provided better results in sperm binding for ocelots ( $8.5 \pm 1.3$ ) ( $p < 0,01$ ) and for domestic cats ( $4.3 \pm 0.9$ ) ( $p < 0,05$ ), while the slow cooling method favoured  $2.5 \pm 0.3$  ocelot sperm and  $1.4 \pm 0.2$  domestic cat sperm binded per oocyte. Differences between treatments within species might be the result of species-specific and/or individual differences in sperm cell structure and function. From this data we concluded that cryopreservation protocols must be still improved and adapted to species individually and also that the competitive sperm-binding assay was efficient to detect differences in sperm function between treatments, which was not possible from the routine sperm evaluation procedures used here.

KEY-WORDS: sperm cryopreservation, *in vitro* sperm binding assay, *in vitro* maturation, cooling rate, feline

## 1.INTRODUÇÃO

A busca de estratégias para a manutenção de inúmeras espécies que estão em risco de extinção tem impulsionado a comunidade científica a pesquisar alternativas para a preservação de material genético, com intuito de formação de bancos de genoma (WILDT e ROTH, 1997; SWANSON *et al.*, 2003). Nos programas de preservação de felinos ameaçados de extinção, estudos para maior conhecimento da fisiologia reprodutiva e o aperfeiçoamento de técnicas de reprodução assistida têm conquistado um espaço importante e resultam do progresso efetuado na aplicação destas biotécnicas em gatos domésticos (POPE, 2000). É importante ressaltar que a criopreservação deve garantir a qualidade e a viabilidade do material armazenado e, conseqüentemente, pesquisas visando o estabelecimento de métodos mais eficientes para preservar o material genético passam a ter importância fundamental. Entre os diferentes tipos de tecidos e/ou células armazenados estão os gametas, e para os felinos selvagens Sul-Americanos, SWANSON *et al.* (2003) iniciaram um banco de genoma com amostras congeladas de sêmen e, posteriormente, produziram 76 embriões de jaguatirica e 52 embriões de gato-do-mato-pequeno que foram criopreservados para transferência posterior (SWANSON e BROWN, 2004).

Em paralelo ao estabelecimento de bancos de genoma, está a aplicação das biotécnicas reprodutivas em felinos, as quais têm sido estudadas com ênfase acentuada, atingindo um progresso significativo nos últimos anos. Dentro desse contexto, o gato doméstico é considerado um modelo experimental valioso e confiável para o desenvolvimento de técnicas de reprodução assistida aplicáveis à espécies selvagens (POPE, ZHANG e DRESSER, 1991; GOODROWE, 1992; FARSTAD, 2000). A possibilidade de usar o gato doméstico como modelo para doenças humanas e para estudos de distúrbios de origem genética estimulam o desenvolvimento destas biotécnicas em felinos (FARSTAD, 2000). Outro fator que corrobora para o “modelo gato doméstico” é a disponibilidade de material biológico em clínicas veterinárias que fazem

esterilizações de rotina, proporcionando a oferta de gônadas cuja utilização não tem implicações éticas, já que estariam destinadas ao descarte. POPE (2000) ainda reforça o papel do gato doméstico não somente como modelo para o desenvolvimento da reprodução assistida, mas também como recipiente para embriões de várias espécies de pequenos felinos selvagens. Entre as biotécnicas reprodutivas estão a maturação e fecundação *in vitro* de ovócitos, a injeção espermática intracitoplasmática, a criopreservação de folículos, ovócitos, sêmen e embriões, com subsequente transferência embrionária (GOODROWE, 1992; WILDT e ROTH, 1997; FARSTAD, 2000).

Com relação aos estudos com machos felinos, destaca-se a variabilidade na qualidade do sêmen entre espécies e indivíduos (SWANSON *et al.*, 2003; MORAIS *et al.*, 2002). A teratospermia, grande quantidade de espermatozoides morfológicamente anormais no ejaculado é uma característica que torna a criopreservação de sêmen felino um desafio. Além da qualidade já comprometida do sêmen fresco para alguns indivíduos, os espermatozoides sofrem significativamente com todo o processo que envolve o congelamento e o descongelamento, levando à uma severa redução em seus índices vitais e funcionais (GOODROWE, 1992). Várias tentativas vêm sendo feitas com a finalidade de aumentar a taxa de recuperação do sêmen criopreservado em carnívoros, incluindo, entre outras, a determinação das melhores taxas de resfriamento, concentrações ideais de meio crioprotetor, assim como modificações nos componentes dos meios crioprotetores (SWANSON *et al.*, 1996b; PUKAZHENTHI *et al.*, 1999). A capacidade fertilizante do espermatozoide, após atingir as proximidades do gameta feminino, depende de sua capacidade de cruzar a barreira seletiva de entrada no ovócito, a zona pelúcida (YANAGIMACHI, 1994), e a preservação desta habilidade é necessária nos métodos de criopreservação. Neste sentido, métodos *in vitro* de estimar a capacidade do espermatozoide interagir com a zona pelúcida têm sido desenvolvidos: testes de ligação e/ou penetração espermática na zona pelúcida e testes de fertilização *in vitro* (WABERSKI *et al.*, 2005). Outra forma de se avaliar a função dos

espermatóides é a inseminação de um grupo de fêmeas e a observação do índice gestacional subsequente, porém, em se tratando de espécies selvagens com número limitado de espécimes, este tipo de teste não se aplica. Deste modo, ensaios de ligação espermática utilizando ovócitos homólogos ou heterólogos maturados *in vitro*, tanto frescos como preservados em solução salina, têm sido empregados na avaliação funcional de várias espécies, incluindo felinos (ANDREWS *et al.*, 1992; SWANSON *et.al*,1996b). Sabe-se que a ligação espermática à zona pelúcida no ovócito de gato possui menor especificidade permitindo a utilização de ovócitos de gato doméstico para avaliar a ligação espermática de espécies de felinos selvagens (ANDREWS *et al.*, 1992; ROTH *et al.*, 1995; SWANSON *et. al*, 1996b). Esta menor especificidade foi observada na zona pelúcida de ovócitos de bovinos e suínos (SINOWATZ *et al.*, 2003).

Os resultados de ensaios de ligação espermática *in vitro*, entretanto, são afetados por um número muito grande de variáveis, tais como a variabilidade natural entre os ovócitos, dependendo das condições da doadora, e das condições laboratoriais, levando também à necessidade de um grande número de ovócitos a serem avaliados. Para minimizar esta variabilidade, uma das alternativas são os ensaios utilizando hemi-zonas, onde o teste de ligação espermática para comparar indivíduos ou tratamentos diferentes são realizados em metades idênticas de zonas pelúcidas (WABERSKI *et al.*, 2005).

## 2. OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito de dois protocolos de resfriamento pré-congelamento do sêmen felino (gato-do-mato-pequeno, *Leopardus tigrinus*; jaguatirica, *Leopardus pardalis* e gato doméstico, *Felis catus*) sobre a qualidade espermática pós-descongelamento, incluindo a capacidade de ligação espermática *in vitro* em zona pelúcida de ovócitos de gato doméstico.

### 2.1 Objetivos Específicos

1. Avaliar as características físicas e morfológicas do sêmen fresco;
2. Avaliar, por meio de microscopia óptica, o efeito da criopreservação, com dois protocolos de resfriamento do sêmen, sobre a motilidade espermática e percentual de células com acrossoma intacto;
3. Avaliar, por meio de citometria de fluxo, o efeito dos dois métodos de resfriamento sobre o percentual de células viáveis após o descongelamento;
4. Avaliar a taxa de maturação *in vitro* de ovócitos de gatas domésticas;
5. Avaliar a eficácia da utilização de ovócitos desnudos em ensaios de ligação espermática *in vitro*;
6. Avaliar a capacidade pós-descongelamento de ligação espermática *in vitro* na zona pelúcida de ovócitos de gatas domésticas em ensaios de ligação competitiva entre espermatozóides tratados pelos dois métodos;
7. Verificar possíveis correlações entre as características do ejaculado pós-descongelamento com os resultados de ligação espermática pós-descongelamento;
8. Verificar diferenças espécie-específicas para as variáveis estudadas.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Biotécnicas reprodutivas em pequenos felinos Sul-Americanos

Os felinos selvagens sul-americanos estão compreendidos em 10 espécies adaptadas a variados habitats, incluindo a jaguatirica (*Leopardus pardalis*) e o gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*) que são classificados como gatos pequenos (peso menor que 15 kg) (SWANSON *et al.*, 2003). Exceto o gato doméstico, todas as espécies estão, em diferentes graus, ameaçadas de extinção. A preservação destas espécies em vida livre enfrenta problemas como a fragmentação progressiva de seu hábitat natural (MORAIS *et al.*, 2002), assim como conflitos com pecuaristas em áreas limítrofes de seu território. Portanto, estratégias efetivas de conservação, envolvendo a preservação do hábitat e definição de manejo adequado em cativeiro, são fundamentais para o sucesso da reprodução natural e/ou assistida e a consequente manutenção da variabilidade genética de populações livres e em cativeiro (WILDT e ROTH, 1997; SWANSON e WILDT, 1997).

Na tentativa de se utilizar das biotécnicas reprodutivas como ferramenta conservacionista, alguns resultados já foram obtidos no gênero *Leopardus* como a inseminação artificial com sêmen fresco e congelado na jaguatirica (SWANSON *et al.*, 1996a; MORAES *et al.*, 1997) e no gato-do-mato-pequeno (MORAES *et al.*, 1997), a produção de embriões por meio de fertilização *in vitro* na jaguatirica e no gato-do-mato-pequeno (MILLER *et al.*, 1990; SWANSON *et al.*, 2001) e a transferência de embrião pós-congelamento na jaguatirica (SWANSON *et al.*, 2001).

Com o objetivo de iniciar um banco de genoma com sêmen de alta qualidade e futuro potencial reprodutivo, SWANSON *et al.*, (2003) criopreservaram 59 amostras de sêmen de 185 felinos representantes de oito espécies endêmicas da América Latina, sendo que este material permite potencialmente cerca de 100 procedimentos de inseminação artificial ou 26.000 fertilizações *in vitro*. Além disso,

também foram produzidos 64 embriões de jaguatirica e 52 embriões de gato-do-mato-pequeno que foram criopreservados para transferência posterior (SWANSON *et al.*, 2002).

### 3.2 Colheita de sêmen em felinos

O método de colheita do sêmen em felinos, assim como em outras espécies, pode afetar a concentração espermática, a motilidade e até, provavelmente, o potencial de fertilidade das células espermáticas. O uso de vagina artificial em doadores treinados proporciona amostras naturalmente melhores para a criopreservação (HOLT, 2000), entretanto, em felinos, estes casos são raros, mesmo em se considerando o gato doméstico. Portanto, a eletroejaculação, sob anestesia geral, é o método mais adequado para se reduzir o estresse e o risco para o animal assim como para a equipe de trabalho durante a colheita de sêmen (HOWARD *et al.*, 1986; HOWARD, 1993). Este método foi aplicado com sucesso em várias espécies de felinos como o tigre (*Panthera tigris* – DONOGHUE *et al.*, 1990), o gato-leopardo (*Felis bengalensis* – ANDREWS *et al.*, 1992; PUKAZHENTHI *et al.*, 2000), a jaguatirica (*Leopardus pardalis*- MORAIS *et al.*, 2002; QUEIROZ *et al.*, 2002), o gato-maracajá (*Leopardus wiedii* - MORAIS *et al.*, 2002), o gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus* – MORAIS *et al.*, 2002), o guepardo (*Acinonyx jubatus* – ROTH *et al.*, 1995; SWANSON *et al.*, 1996b), a onça-pintada (*Panthera onca* – SWANSON *et al.*, 1996b; MORATO *et al.*; 1999) e o leopardo-nebuloso (*Neofelis nebulosa* - PUKAZHENTHI *et al.*, 2000; 2002).

Uma outra possibilidade de obtenção de gametas masculinos é a recuperação, após a esterilização ou a morte do animal, de espermatozoides epididimários. Estes espermatozoides, obtidos do trato reprodutivo após orquiectomia de gatos domésticos, têm sido utilizados em ensaios de ligação espermática com eficácia comprovada (GOODROWE, 1992; SPINDLER e WILDT, 1999; RINGLEB, ROHLER e JEWGENOW, 2004).

### 3.3 Avaliação do sêmen

A qualidade do sêmen felino é muito variável entre espécies e indivíduos (MORAIS *et al.*, 2002; SWANSON *et al.*, 2003) e como o objetivo da criopreservação é o armazenamento de material com potencial de fertilização, a avaliação qualitativa do sêmen é de fundamental importância. Esta estimativa deve contemplar vários atributos simultaneamente para garantir maior confiabilidade na determinação do potencial de fertilização (GRAHAM, 2001). A motilidade espermática, percentual de células móveis no ejaculado, e o vigor, qualidade do movimento dos espermatozóides, em combinação, fornecem o índice de motilidade espermática (IME) (HOWARD *et al.*, 1986; HOWARD *et al.*, 1993). Este índice pode estar relacionado com a capacidade de fertilização (DONOGHUE *et al.*, 1992), pois, em amostras de sêmen de guepardo cujo IME declinou rapidamente, a fertilização de ovócitos inseminados foi nula enquanto observou-se uma taxa de fertilização de 62% em dois ejaculados que mantiveram o IME entre 80 e 90 durante quatro horas (GOODROWE, 1992).

Após o descongelamento, o tempo de sobrevivência do espermatozóide é de aproximadamente uma hora para o gato-maracajá, duas horas para a jaguatirica e três horas e meia para o gato-do-mato-pequeno (MORAIS, 2001).

Outro aspecto importante da avaliação do sêmen é a análise da morfologia, a qual estima o percentual de células normais e de anormalidades espermáticas, sendo que as anormalidades mais comuns no sêmen de felinos são: acrossoma anormal, peça intermediária anormal ou ausente, peça intermediária dobrada com ou sem gota citoplasmática, gota proximal ou distal e cauda dobrada ou enrolada (OTA, 2001; SWANSON *et al.*, 2003). As causas dos defeitos morfológicos do sêmen felino ainda não foram identificadas, mas já se demonstrou que existe estreita ligação entre limitada variabilidade genética e altas porcentagens de pleiomorfismo no sêmen de certas espécies e populações. O mais importante disso é que sabe-se que estes espermatozóides estruturalmente anormais não participam da fertilização (HOWARD *et al.*, 1993; SWANSON *et al.*,

2003) e mesmo os espermatozóides aparentemente normais, provenientes de amostras teratospérmicas, podem apresentar redução da capacidade funcional devido à alterações na ultraestrutura celular que podem comprometer a função espermática (HOWARD *et al.*, 1993; MORAIS, 2001). O gato-do-mato-pequeno apresenta alta taxa de sêmen teratospérmico, ou seja, número de espermatozóides normais menor que 40% e estes defeitos morfológicos parecem estar relacionados com a variabilidade genética limitada (SWANSON *et al.*, 2003). Por outro lado, em comparação à jaguatirica, o gato-do-mato-pequeno produz um ejaculado com maior número de espermatozóides por volume seminal (MORAIS *et al.*, 2002).

Um método simples e eficiente de avaliar a integridade do acrossoma é através da técnica de coloração desenvolvida por POPE, ZHANG e DRESSER (1991). Utilizando-se deste método, SWANSON *et al.* (1996a) encontraram uma redução significativa no percentual de acrossomas intactos em sêmen congelado de jaguatirica, com um valor médio de apenas 39% de células normais pós-descongelamento, OTA *et al.* (1998) obtiveram valores de acrossomas intactos pós-descongelamento similar para jaguatirica (39,1%) e ligeiramente superior para gato-do-mato-pequeno (53,3%) e GOODROWE (1992) relatou que após o descongelamento de sêmen epididimário de gato doméstico, menos de 20% dos acrossomas permaneceram intactos.

Uma outra ferramenta importante para estimar a viabilidade espermática é a citometria de fluxo, método que utiliza corantes específicos para avaliar diferentes estruturas celulares de forma rápida e acurada, pois fornece dados de milhares de células (KIRK, 2001). O iodeto de propídio (IP) é um dos fluoróforos mais comumente utilizados para se avaliar a viabilidade celular. É uma molécula relativamente grande que penetra apenas em células com membrana plasmática danificada, corando o DNA de vermelho (emite fluorescência vermelha – 610 nm) (GRAHAM, 1996). O IP é excitado em 488 nm e está validado para análises de viabilidade espermática por citometria em várias espécies (GARNER *et al.*, 1995; BRINSKO *et al.*, 1998). Este método vem sendo utilizado com

sucesso para avaliar sêmen de cães (SZASZ *et al.*, 2000), sêmen eqüino (KIRK, 2001) e também sêmen de felinos domésticos e selvagens (PUKAZHENTHI *et al.*, 2000; 2002).

PUKAZHENTHI *et al.* (1999) relataram uma redução de 81,5% para 23% de células normais pós-descongelamento em sêmen teratospérmico (< 40% de células normais) de gato doméstico, confirmando que as estruturas mais vulneráveis e afetadas pela criopreservação são as membranas plasmática, mitocondrial e acrossomal.

Já a avaliação funcional do espermatozóide é obtida através dos testes *in vitro* de ligação e/ou penetração espermática na zona pelúcida e testes de fertilização que são métodos para estimar a capacidade do espermatozóide interagir com a zona pelúcida (WABERSKI *et al.*, 2005).

### 3.4 Criopreservação do sêmen

No protocolo convencional, ou pelo menos no protocolo mais citado na literatura consultada, para a criopreservação de sêmen de felinos o glicerol, substância crioprotetora permeante com capacidade de minimizar a formação de cristais de gelo no citoplasma (PEÑA *et al.*, 1998; WATSON, 2000), é adicionado gradativamente à suspensão espermática que depois é resfriada a 4°C e congelada na forma de “pellets” sobre perfurações feitas na superfície de gelo seco. Os “pellets” são armazenados em tubos criogênicos mergulhados em nitrogênio líquido e o descongelamento é realizado em 100 µl de meio de cultura em banho-maria a 37°C durante 30 segundos (SWANSON *et al.*, 1996b). Ou alternativamente, o sêmen é envasado em palhetas e congelado no vapor de nitrogênio líquido.

Qualquer que seja o protocolo utilizado, a criopreservação do gameta masculino interrompe os diferentes processos envolvidos na capacitação e aquisição de capacidade fertilizante do espermatozóide pós ejaculação (MAZUR, 1984; AMMAN, 1999). O sucesso da criopreservação depende de vários passos

importantes como a adição do crioprotetor às células antes do resfriamento, da taxa de resfriamento do sêmen pré-congelamento e do método de descongelamento e remoção do crioprotetor após o descongelamento da amostra.

Todas as etapas da criopreservação submetem as células a condições anisomóticas que promovem variações intensas no volume celular, podendo ser potencialmente letais às células. Quando o processo de resfriamento do sêmen pré-congelamento ocorre muito rapidamente, a substituição da água intracelular pelo crioprotetor não ocorre em igual velocidade para manter o equilíbrio e a água que permanece dentro da célula leva à formação de gelo intracelular, causando a morte da célula. Isto não acontece quando o resfriamento é relativamente lento e as células perdem um volume de água suficiente para concentrar o soluto intracelular. Em contrapartida, células resfriadas muito lentamente sofrem uma perda severa de água e são expostas por um longo período a uma solução com alta concentração de soluto, fatores que também causam lesão celular. Portanto, apesar dos diferentes mecanismos, ambas as velocidades de resfriamento podem causar dano celular e um espermatozóide que sobreviveu a temperaturas abaixo de zero ainda sofrerá os efeitos do descongelamento e remoção do crioprotetor, que são comparáveis aos do congelamento (HAMMERSTEDT, GRAHAM e NOLAN, 1990; AGCA e CRITSER, 2002).

O índice de sobrevivência dos espermatozoides após a criopreservação, além da qualidade inicial da amostra, depende da interação da velocidade de resfriamento, composição do meio crioprotetor e velocidade de descongelamento, entre outros fatores (MAZUR, 1984; WATSON, 2000) e, independentemente da espécie estudada, cerca de 50% das células espermáticas congeladas não sobrevivem após o descongelamento ou apresentam características muito distintas daquelas do sêmen fresco (MAZUR, 1984; AMANN, 1999). PUKAZHENTHI *et al.* (2004), em estudo sobre a motilidade e o percentual de espermatozoides com acrossoma intacto do sêmen fresco de gato doméstico, resfriado pelos métodos rápido e lento, e criopreservado, observaram resultados

similares nos dois métodos de resfriamento utilizados. Os autores relataram que a motilidade foi similar ( $p > 0,05$ ) e reduziu de 70% (sêmen fresco) para 48,8% e 35,0% para os métodos de resfriamento rápido e lento, respectivamente. Em relação ao percentual de células com acrossoma intacto, os autores observaram resultados similares entre os tratamentos com redução de 11,5% (sêmen fresco) para 4,1% e 5,0% para o resfriamento rápido e lento, respectivamente.

Durante o resfriamento do sêmen da temperatura corporal até 0°C, alguns espermatozóides podem sofrer lesões distintas daquelas causadas pela congelação, pelo estresse osmótico ou pela toxicidade do crioprotetor. Este fenômeno tem sido chamado de sensibilidade ao choque frio e é particularmente observado em espermatozóides que são resfriados lentamente e caracteriza-se pela perda permanente da motilidade (AGCA e CRITSER, 2002). Esta sensibilidade varia com a espécie e é atribuída pela diferente composição lipídica (fosfolipídios, glicolipídios e esteróis) existente entre as espécies (HAMMERSTEDT, GRAHAM e NOLAN, 1990; AGCA e CRITSER, 2002). Um estudo recente no Brasil demonstrou que o resfriamento do sêmen de jaguatirica da temperatura ambiente para 9°C já é suficiente para causar lesões significativas no acrossoma (QUEIROZ *et al.*, 2002). PUKAZHENTHI *et al.* (1999) demonstraram que o método de resfriamento rápido do sêmen de gato doméstico, da temperatura ambiente até 5°C, causou um declínio no percentual de espermatozóides com acrossoma intacto de 81,5% (sêmen fresco) para 65,5%, enquanto o método de resfriamento lento reduziu este percentual para 75,5%.

Deve-se considerar também variações individuais quanto à resistência dos espermatozóides à criopreservação e conseqüente manutenção da viabilidade e do potencial de fertilização, pois a mesma depende de características determinadas geneticamente (SONGSASEN e LEIBO, 1997; HOLT, 2000; YU *et al.*, 2002).

A criopreservação reduz a motilidade dos espermatozóides epididimários de felinos em 30 a 40% em comparação aos valores pré-

congelamento (GOODROWE, 1992). SWANSON *et al.* (1996a) obtiveram 40 a 60% de motilidade e 3 a 4 de vigor espermático após o descongelamento e processamento de amostras de sêmen de jaguatiricas e OTA *et al.* (1998) e MORAIS (2001) encontraram uma redução no índice de motilidade espermática para jaguatirica e gato-do-mato-pequeno na ordem de 26% e 20% respectivamente.

Uma alternativa para contornar o obstáculo reprodutivo proporcionado pela baixa qualidade do sêmen é a inseminação cirúrgica, na qual o conteúdo inseminado é introduzido próximo ao ápice do corno uterino alcançando uma fertilidade mais satisfatória, e que já vem sendo feita regularmente em felinos (WATSON, 2000). Outras possibilidades incluem a fertilização *in vitro* e técnicas microassistidas como a injeção espermática intracitoplasmática que permite a fertilização por espermatozóides com baixa motilidade e vigor (FARSTAD, 2000; POPE, GOMEZ e DRESSER, 2004; COMIZZOLI, WILDT e PUKAZHENTHI, 2004).

### 3.5 Ensaio *in vitro* de avaliação da função espermática

A ligação entre o ovócito e o espermatozóide envolve o reconhecimento dos receptores de espermatozóides presentes na zona pelúcida do ovócito e as proteínas de ligação correspondentes na superfície do espermatozóide (RATH *et al.*, 2005; SINOWATZ *et al.*, 2003). Como pré-requisito para reação acrossomal, os espermatozóides têm que sofrer a capacitação e os ovócitos devem atingir o estágio de metáfase II. E o citoplasma do ovócito e suas organelas têm que completar o processo de maturação, porque é o contato inicial entre o espermatozóide e a zona pelúcida, que já sofreu alterações bioquímicas e funcionais conseqüentes do processo de maturação, que induz a reação acrossomal permitindo a exposição dos receptores secundários presentes na membrana do espermatozóide (RATH *et al.*, 2005). Testes funcionais podem ser realizados com o objetivo de avaliar a capacidade do espermatozóide em penetrar

o ovócito, como no ensaio de penetração em zona pelúcida do ovócito de gato doméstico (ANDREWS *et al.*, 1992) ou, ainda, o ensaio de penetração em ovócito de hamster, livre de zona pelúcida (MORATO e BARNABE, 1998). STRÖM-HOLST *et al* (2000) compararam ensaios de ligação espermática em cães entre ovócitos frescos, armazenados em salina e provenientes de ovários congelados. Encontraram uma diferença significativamente maior de ligação espermática em ovócitos frescos, mas também observaram que, apesar do efeito negativo no potencial de ligação espermática apresentado pelo ovócito armazenado em salina e pelo ovócito coletado de ovário congelado, os resultados indicaram que estes gametas podem ser utilizados nos ensaios para avaliação de função espermática. Ensaio com ovócito ou zona pelúcida foram utilizados para avaliar o potencial fertilizante de espermatozóides em canídeos (FARSTAD, 2000; GOODROWE *et al.*, 1998) e em felinos (HOWARD *et al.*, 1990; ANDREWS *et al.*, 1992; GOODROWE, 1992; LENGWINAT e BLOTTNER, 1994), podendo também ser empregados para avaliar o efeito da criopreservação sobre a função espermática.

Em um estudo sobre a capacitação espermática do gato doméstico (*Felis catus*) e do gato-leopardo (*Felis bengalensis*), utilizando ensaio de penetração em zona pelúcida, ANDREWS *et al.* (1992) concluíram que a zona pelúcida do ovócito do gato doméstico não apresentou bloqueio à penetração do espermatozóide da outra espécie, confirmando que este tipo de ensaio pode ser usado como alternativa à fertilização *in vitro* para avaliar a capacitação espermática das espécies estudadas. Os autores relataram ainda que a adição de albumina sérica bovina, como fonte de proteína, ao meio de incubação do ovócito com o sêmen facilita a penetração do espermatozóide felino na zona pelúcida o que foi comprovado por HOWARD e WILDT (1990) ao avaliar a penetração do espermatozóide de leopardo em ovócito de gato doméstico.

Ao comparar a capacidade de penetração de sêmen teratospérmico e normospérmico, através de ensaio em zona livre de ovócito de hamster, e em ovócitos imaturos de gato doméstico, HOWARD, BUSH e WILDT (1991) observaram que o sêmen teratospérmico apresentou menor capacidade de

penetração mesmo quando a amostra foi selecionada pelo procedimento de “swim-up” para aumentar a motilidade e o número de células normais no volume inseminante. Na avaliação de uma amostra de sêmen contendo 71,4% de células pleiomórficas, os espermatozóides estruturalmente anormais foram capazes de se ligar à zona pelúcida (29,2%) e penetrar a camada externa da zona pelúcida (17,0%). Entretanto, somente 3,3% dos espermatozóides na camada interna da zona pelúcida eram anormais e todos os que se encontravam dentro do espaço perivitelínico eram morfológicamente normais. A proporção de ovócitos de gato com espermatozóides na camada interna da zona pelúcida foi muito maior para sêmen normospérmico (73,7%) do que para a amostra teratospérmica (24,1%) e esta função comprometida parece ser inerente ao ejaculado teratospérmico e não depende do número de espermatozóides estruturalmente normais no volume inseminante (HOWARD, BUSH e WILDT, 1991). Portanto, não é somente a presença absoluta de espermatozóides pleiomórficos, mas também fatores desconhecidos associados à espermatozóides estruturalmente normais de doadores teratospérmicos que apresentam impacto no sucesso da fertilização *in vitro* nos felinos (HOWARD *et al.*, 1993). Este fenômeno pode explicar as baixas taxas reprodutivas em felinos selvagens com altas proporções de espermatozóides anormais (GOODROWE, 1992). A função espermática comprometida nos gatos teratospérmicos pode estar associada com defeitos na espermatogênese e na maturação durante o transporte epididimário (HOWARD, 1990; HOWARD, BUSH e WILDT, 1991). Os espermatozóides estruturalmente anormais, quando presentes em grande proporção no sêmen, influenciam a interação *in vitro* entre espermatozóide e ovócito e também a formação de embriões clivados (HOWARD, BUSH e WILDT, 1991; WILDT *et al.*, 1992).

Na fertilização *in vitro* utilizando sêmen fresco e sêmen congelado em ovócitos do gato doméstico foram encontradas diferenças significativas nas taxas de clivagem entre o sêmen fresco (40,7%) e o sêmen criopreservado (25,3%) (LENGWINAT e BLOTTNER, 1994), e resultados semelhantes foram encontrados por GOODROWE (1992) que observou que 20% dos ovócitos maturados *in vitro*

inseminados com sêmen epididimário fresco foram fertilizados, enquanto somente 2% dos ovócitos foram fertilizados quando o mesmo sêmen criopreservado foi utilizado, atribuindo estas baixas taxas a lesões severas do acrossoma. Em estudos utilizando sêmen bovino em ensaio de competição espermática, observou-se que nem sempre o sêmen com maior capacidade fertilizante é necessariamente o mais resistente à criopreservação (HOLT, 2000).

Existem inúmeras variáveis que afetam os ensaios de ligação espermática, e os fatores relacionados à qualidade dos ovócitos são de fundamental importância e variam com as condições nutricionais e fase reprodutiva da doadora e com os critérios de seleção dos ovócitos e sistemas de cultivo. Uma alternativa para contornar estas variáveis é o uso de hemizonas no ensaio, realizado em metades idênticas de zonas pelúcidas, e que é ideal para comparar indivíduos ou tratamentos diferentes. Entre outros ensaios que estão sendo testados, está a ligação espermática em epitélio do oviduto que, *in vivo*, garante sobrevivência, capacitação e transporte controlado até o local da fertilização. A ligação do espermatozóide ao epitélio do oviduto avalia a membrana plasmática para múltiplas funções necessárias à fertilização e, de acordo com dados preliminares obtidos com bovinos, após devidamente validado para sensibilidade e especificidade, este ensaio poderá ser utilizado para estimar fertilidade em machos (WABERSKI *et al.*, 2005).

A fertilização *in vitro* é uma ferramenta valiosa para se avaliar a função do espermatozóide e para estudar a interação de gametas nos felinos domésticos e selvagens (WILDT *et al.*, 1992). Porém, em virtude da diferença existente entre os mecanismos de seleção espermática no trato genital da fêmea e os métodos de seleção *in vitro*, os testes *in vitro* não produzem estimativas de fertilidade, mas servem para determinação de características funcionais do espermatozóide (WABERSKI *et al.*, 2005).

### 3.6 Fonte de ovócitos para ensaios *in vitro*

Os ensaios desenvolvidos para avaliação do potencial de fertilização dos espermatozóides utilizam ovócitos maduros e, em alguns estudos, ovócitos maturados *in vivo* são obtidos através da aspiração laparoscópica dos folículos ovarianos de fêmeas previamente tratadas com hormônios (DONOGHUE *et al.*, 1990; HOWARD *et al.*, 1993; ROTH, SWANSON e WILDT, 1994; SWANSON *et al.*, 2002; POPE *et al.*, 2003). Entretanto, o risco anestésico ao qual estes animais são submetidos durante o procedimento de coleta e o fato destes ovócitos ainda necessitarem de incubação extra para atingir a fase de metáfase II (BYERS *et al.*, 1992) tornam este tipo de procedimento mais indicado para pesquisas avançadas que envolvem fecundação *in vitro*, injeção espermática intracitoplasmática e transferência de embrião (SWANSON *et al.*, 2002; POPE *et al.*, 2003).

Uma alternativa mais simples é a utilização de ovócitos foliculares imaturos, coletados de ovários provenientes de esterilizações, maturados *in vitro* e que possibilitam a execução de ensaios de ligação espermática para avaliação funcional do sêmen com eficácia comprovada (SPINDLER e WILDT, 1999). Grande parte dos ovócitos permanecem quiescentes durante a vida reprodutiva da fêmea e estas células constituem um valiosa fonte de material genético para técnicas de reprodução assistida, especialmente para a maturação e fertilização *in vitro* (WOOD, MONTALI e WILDT, 1997). Estudos de maturação *in vitro* de ovócitos de gato doméstico estão descritos na literatura desde 1989 (JOHNSTON, O'BRIEN e WILDT, 1989). Estes estudos são muito importantes, pois proporcionam a preparação do laboratório e o treinamento da equipe necessários para aplicação de biotécnicas mais avançadas, tornando possível a recuperação de material genético de fêmeas selvagens que morreram ou que por motivos médicos foram esterilizadas. Os ovários de felinos domésticos estão disponíveis em clínicas veterinárias e fundamentam as pesquisas na biologia das células germinativas, que podem ser conduzidas sem barreiras éticas, e as técnicas *in*

*vitro* desenvolvidas para esta espécie felina são amplamente adaptadas à outras espécies (JEWGENOW e STOLTE, 1996).

Outra fonte de gametas femininos de felinos domésticos e selvagens é a utilização dos folículos pré-antrais que apresentam ultraestrutura similar às outras espécies de mamíferos e viabilidade de 28,7% para gato doméstico e entre 20 e 50% para as espécies selvagens (JEWGENOW e STOLTE, 1996).

Uma vez colhidos, os ovócitos devem ser classificados de acordo com a qualidade morfológica, sendo que estes critérios servem como base para a seleção dos complexos cúmulus-ovócitos. Os ovócitos grau I apresentam citoplasma escuro e homogêneo, sem vacúolos citoplasmáticos e totalmente envolvidos por no mínimo duas camadas de células do cúmulus (WOOD e WILDT, 1997; COMIZZOLI, WILDT e PUKAZHENTHI, 2003; RINGLEB, ROHLER e JEWGENOW, 2004; JEWGENOW, comunicação pessoal) e os ovócitos grau II são aqueles em que o citoplasma não está tão escuro ou que apresentam discretos vacúolos no citoplasma (JEWGENOW, comunicação pessoal). A porcentagem de ovócitos de alta qualidade (grau I) não é afetada pela fase em que o ovário se encontra (folicular, luteal ou inativo) (SPINDLER e WILDT, 1999) e a proporção de ovócitos em atresia nas fases luteal e folicular do ciclo ovariano é similar (WOOD, MONTALI e WILDT, 1997). Nos meses de outono a quantidade de complexos cúmulus-ovócitos grau I é menor e estes apresentam capacidade de maturação nuclear e formação de embriões reduzida. A maioria destes ovócitos não apresentou espermatozóides que ligaram ou penetraram a zona pelúcida e esta baixa receptividade da zona pelúcida pode ser a primeira, mas não a única, barreira à fertilização nesta estação (SPINDLER e WILDT, 1999).

### 3.7 Maturação *in vitro* dos ovócitos

Os gatos são carnívoros poliétricos sazonais com atividade sexual durante os meses de dias com fotoperíodo longo e inatividade sexual durante os meses de

declínio de luminosidade. Ao contrário dos canídeos e da maioria dos animais domésticos, os felinos apresentam, em geral, ovulação reflexa e, 24 a 48 horas após o acasalamento, os ovócitos são ovulados como ovócitos secundários em metáfase II (FARSTAD, 2000). A taxa de maturação *in vitro* de ovócitos de felinos é relativamente alta, entre 40 e 60%, e depende da qualidade do ovócito e da suplementação hormonal do meio de maturação (GOODROWE, HAY e KING, 1991; WOOD *et al*, 1995; WOOD e WILDT, 1997). A expansão das células cúmulus é um marcador da maturação do ovócito, entretanto, em muitas espécies de mamíferos entre elas o gato, ainda não se esclareceu qual a relação entre a expansão das células cúmulus e a maturação nuclear ou capacidade fertilizante dos ovócitos (BYERS *et. al*, 1994).

Segundo GOODROWE, HAY e KING (1991), a maior incidência de metáfase II pode ser esperada após 40 a 48 horas de maturação *in vitro*, tempo similar ao período do acasalamento à ovulação na gata. Entretanto, WOLFE e WILDT (1996) relataram que a maioria dos ovócitos atingiram a metáfase II com 24 horas de maturação *in vitro*, e que a inseminação após 40 horas não resultou em desenvolvimento de blastocisto. Os felinos apresentam maior taxa de maturação em menor tempo (40 a 60% em 24 horas) em comparação aos canídeos (0 – 58% em 48 – 72 horas), mas menor em relação à maioria dos animais de produção que alcançam índices acima de 80% em 24 horas (FARSTAD, 2000). WOLFE e WILDT (1996) observaram que mesmo ovócitos provenientes de ovários de felinos armazenados a 4°C em solução salina por 24 e 48 horas foram capazes de atingir a maturação meiótica e a clivagem em índices iguais a 51% e 25% respectivamente. Afora isso, WOOD, MONTALI e WILDT, (1997) relataram que o armazenamento dos ovários em solução salina a 4°C por até 48 horas não causa degeneração nos ovócitos e este grau de tolerância ao resfriamento proporciona a recuperação de material de alto valor genético e/ou de felinos raros que morreram em locais distantes de laboratórios capacitados para procedimentos de maturação e fertilização *in vitro*.

Os ovócitos de felinos apresentam características únicas e conseqüentemente as condições para maturação *in vitro* diferem dos outros modelos de mamíferos, e criar um microambiente similar àquele em que ocorre a maturação fisiológica é um desafio, considerando que pouco se conhece sobre os mecanismos que regulam a maturação dos ovócitos de felinos. Os sistemas de maturação *in vitro* devem suportar os desafios da dinâmica de maturação nuclear e citoplasmática que ocorre em todos os componentes dos complexos-cúmulus-ovócitos. Os meios fisiológicos protegem os ovócitos de lesões de oxidação, entretanto, ovócitos cultivados *in vitro* estão expostos a altas concentrações de oxigênio que causam um aumento no risco de inativação enzimática, peroxidação da membrana lipídica e alterações no DNA causadas por produtos intermediários do metabolismo oxidativo. A presença de gonadotropinas no meio de maturação de complexos-cumulus-ovócitos de felinos promove a persistência das junções entre as células cúmulus e o ovócito e mantém o nível de AMPc dentro do ovócito adequado para que a primeira divisão meiótica ocorra (LUVONI e CHIGIONI, 2004).

RINGLEB, ROHLER e JEWGENOW (2004) observaram uma taxa de maturação nuclear de 77,3% e SPINDLER e WILDT (1999), estudando o efeito da sazonalidade sobre a maturação do ovócito, obtiveram valores entre 10 e 65%. O efeito de sazonalidade associado à atividade quiescente do ovário e ao crescimento folicular reduzido foi confirmado por FREISTEDT, STOJKOVIC e WOLF (2001), e a flutuação circannual dos hormônios reprodutivos e das concentrações de receptores é um fator que pode afetar a qualidade e o desenvolvimento do ovócito (SPINDLER e WILDT, 1999).

LOPES (2002) observou maior taxa de maturação (44,68%) em gatas adultas, em comparação às fêmeas pré-púberes (25,32%) e, apesar destas últimas fornecerem um maior número de folículos ovarianos, estes ovócitos têm menor potencial para maturação *in vitro*. No período pré-ovulatório, o surgimento das gonadotrofinas estimula as células cúmulus a produzir o ácido hialurônico, uma glicosaminoglicana, que se liga às células cúmulus e expande os espaços

entre elas, deixando-as embebidas em uma matriz mucinosa, processo este importante para a ovulação (EPPIG, 2001).

O hormônio folículo estimulante (FSH) é considerado essencial para o desenvolvimento do folículo dominante, para a viabilidade dos folículos em geral e para o controle da atresia (SPINDLER e WILDT, 1999). O FSH também é um suplemento importante para a maturação *in vitro*, pois auxilia as células da granulosa na expansão das células cúmulus (JOHNSTON, O'BRIEN e WILDT, 1989; EPPIG, 2001) e a diferenciação apropriada das células cúmulus é necessária para o desenvolvimento normal do ovócito (EPPIG, 2001). Por esta razão, SPINDLER e WILDT (1999) consideraram a possibilidade da baixa concentração de FSH circulante e/ou menor quantidade de receptores de FSH contribuírem para a eficiência reduzida da maturação *in vitro* durante o período não reprodutivo, possivelmente por afetar a qualidade do ovócito.

Para evitar este efeito, COMIZZOLI, WILDT e PUKAZHENTHI (2003) demonstraram que a suplementação do meio de maturação com grande quantidade de FSH (10 µg /ml) aumenta significativamente o índice de ovócitos maduros em comparação a meios menos concentrados (1 ou 5 µg/ml), pois a maior concentração de FSH permite o uso de todos os receptores disponíveis, mesmo que em menor número, facilitando a comunicação entre as células somáticas e o ovócito. Entretanto, há dificuldade de se comparar as diversas concentrações hormonais utilizadas em experimentos de maturação *in vitro* porque são empregados hormônios de diferentes pureza e origem e quaisquer contaminantes podem influenciar a maturação nuclear a expansão das células cúmulus (COMIZZOLI, WILDT e PUKAZHENTHI, 2003).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os reagentes, corantes, meios de cultivo e suplementos utilizados no presente estudo, exceto quando especificados, foram adquiridos da Sigma-Aldrich®. Os meios de cultivo e soluções estoque foram preparados com água ultrapura (Sistema Puritech – Permuton, E.J. Krieger & Cia Ltda), em vidraria estéril, sendo, a seguir, filtrados (Sterifil 47 mm, 22µm, Millipore) e transferidos em alíquotas, para frascos estéreis, sob capela de fluxo laminar.

### 4.1 Animais

Os animais utilizados neste estudo pertenceram à coleção de pequenos felinos do Zoológico de Curitiba, Curitiba – PR, da Fundação Hermann Weege – Zoológico Pomerode, Pomerode - SC e do Criadouro Conservacionista da Indústria Klabin em Telêmaco Borba - PR, sendo três machos adultos de jaguatirica (*Leopardus pardalis*) e quatro machos adultos de gato-do-mato-pequeno (*L. tigrinus*). Como grupo comparativo foram utilizados quinze machos adultos de gato doméstico (*Felis catus*) mantidos no gatil do Departamento de Anatomia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

### 4.2 Protocolo anestésico

Antes de cada colheita, os indivíduos foram mantidos em jejum alimentar de 12 a 24 horas. Para as espécies selvagens, o animal era capturado no recinto com uma rede (tipo coador) e, em seguida, contido fisicamente para a administração das drogas anestésicas. A anestesia foi induzida com uma combinação de cloridrato de cetamina (Ketalar, Parke-Davis; 20 mg/kg) e xilazina (Ronpum 2%, Bayer, São Paulo; 1,0 mg/kg) injetados pela via intramuscular, com

seringa e agulhas descartáveis (MORAIS, 1999). Após o período de indução anestésica, o animal era retirado da rede e transportado até a sala utilizada para a colheita de sêmen, onde era primeiramente pesado. O Médico Veterinário responsável pela anestesia iniciava a monitorização das funções vitais por meio de ausculta das frequências cardíaca e respiratória com estetoscópio e também com auxílio de oximetria de pulso. Quando necessário, corrigia-se a administração de anestésico em função de diferenças detectadas entre o peso estimado e o peso real do animal, ou ainda efetuava-se o reforço da dose nos casos em que o animal não apresentasse grau de relaxamento adequado para a eletroejaculação. Somente após a liberação pelo anestesista responsável, os procedimentos de exame da genitália externa e colheita de sêmen eram iniciados. Para os espécimes domésticos seguiu-se o mesmo procedimento, exceto a contenção física inicial que era feita apenas manualmente.

#### 4.3 Colheita do sêmen

A colheita de sêmen foi efetuada por meio de eletroejaculação e os procedimentos utilizados foram descritos detalhadamente por HOWARD *et al.* (1986) e HOWARD (1993). Em resumo, a eletroejaculação consiste na aplicação de estímulos elétricos com estimulador de corrente alternada (60Hz; P.T. Eletronics, Boring, Oregon, 97009, EUA) e transdutor retal com três eletrodos longitudinais, construído em “teflon” (P.T. Eletronics, Boring, Oregon, 97009, EUA) medindo 1,0 cm de diâmetro por 13,0 cm de comprimento para *Felis catus* e *Leopardus tigrinus*, e 1,6 cm de diâmetro por 23 cm de comprimento para *Leopardus pardalis*.

Cada animal recebeu um total de 80 estímulos, variando de 2 a 5 V (volts), aplicados em três séries de 30, 30 e 20 estímulos cada. Um intervalo de 5 a 10 minutos foi dado entre as séries. O sêmen foi recolhido em copos estéreis com dimensões apropriadas para cada espécie (*Leopardus tigrinus* e *Felis catus* 2,0 X 2,0 cm e *Leopardus pardalis*, 2,4 X 5,0 cm). Copos individuais foram utilizados

para cada grupo de 10 estímulos numa mesma voltagem e ao final de cada série, e na ausência de contaminação por urina, o conteúdo dos três copos coletores foram combinados e transferidos para um tubo de centrífuga (1,5 ml). Para evitar contaminação do ejaculado e choque térmico, todo o material a entrar em contato com o sêmen era esterilizado e mantido aquecido entre 35 e 37°C (MORAIS, 1999).

#### 4.4 Avaliação do sêmen fresco

A colheita e avaliação do sêmen dos gatos domésticos foram realizadas no Laboratório de Fisiologia da Reprodução, localizado no Departamento de Fisiologia do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Para os felinos selvagens, a colheita do sêmen foi realizada nas instituições mantenedoras destes animais, em sala adaptada para este fim, onde os equipamentos de laboratório foram instalados com finalidade de permitir a avaliação do sêmen imediatamente após a colheita do mesmo, o processamento e congelamento das amostras.

A avaliação das características físicas e morfológicas do ejaculado seguiu protocolo padronizado para felinos, conforme descrição detalhada por HOWARD, BUSH e WILDT (1986), HOWARD *et al.* (1993) e MORAIS (1999). O fluido seminal obtido em cada uma das séries foi avaliado para volume total, motilidade e vigor espermáticos, concentração e número total de espermatozoides e morfologia espermática. São descritos, a seguir, apenas os procedimentos cujas variáveis foram utilizadas para avaliar a eficiência do método de criopreservação.

##### 4.4.1 Motilidade espermática (%)

Logo após a determinação do volume, procedia-se a avaliação do percentual de células móveis no ejaculado, de modo subjetivo, por meio da avaliação de uma gota de sêmen (2,5  $\mu$ l) entre lâmina e lamínula ao microscópio óptico (Carl-Zeiss, Oberkochen, D-73446, Alemanha) e observação de, pelo

menos, quatro campos distintos, com ampliação de 100 vezes. As avaliações foram feitas sempre pelo mesmo pesquisador (OTA, 2001). Avaliações do sêmen pós-descongelamento, como será descrito adiante, para comparação dos tratamentos, eram feitas de modo duplo cego, evitando-se enviesamento dos dados.

#### 4.4.2 Vigor espermático (0 – 5)

A avaliação do vigor espermático foi feita simultaneamente à análise da motilidade espermática, na mesma preparação. Após a análise de pelo menos quatro campos microscópicos, atribuiu-se um valor de zero a cinco, numa escala onde zero = ausência de movimento; 1 = movimento látero-lateral leve, sem progressão linear; 2 = movimento látero-lateral moderado, com movimento progressivo linear ocasional; 3 = progressão linear lenta; 4 = progressão linear consistente e rápida; 5 = progressão linear consistente e máxima. Para motilidade e vigor espermáticos, considerou-se para o ejaculado total, a média dos resultados obtidos nas três séries. Para fins de análise estatística, foram descartados os valores encontrados para as amostras de sêmen (amostras parciais de cada série) contaminadas com urina. A detecção de urina foi feita através da análise da coloração da amostra e medida do pH, sendo consideradas contaminadas aquelas com tonalidade amarelada e pH abaixo de 7,00 (MORAIS,1999).

#### 4.4.3 Índice de Motilidade Espermática (IME).

Para determinar a média global de motilidade espermática, calculou-se o IME, segundo HOWARD (1993), utilizando-se da seguinte fórmula:

$$\text{IME} = [\text{Motilidade (\%)} + (20 \times \text{vigor})] / 2$$

#### 4.4.4 Morfologia espermática e integridade do acrossoma.

Para avaliação da morfologia espermática, uma alíquota de 5 a 10  $\mu\text{l}$  de sêmen, sempre da fração obtida na segunda série de estímulos, foi fixada em 100  $\mu\text{l}$  de glutaraldeído a 0,3% (v:v solução salina), seguindo padronização utilizada por HOWARD (1993). Em cada amostra, um total de 200 células foi examinado sob imersão (1000 x) em microscópio de contraste de fase (Carl-Zeiss, Oberkochen, D-73446, Alemanha). A classificação morfológica foi feita segundo HOWARD (1993) e as células foram agrupadas em normais e com defeitos primários (anomalias de cabeça, acrossoma, peça intermediária e caudas fortemente enroladas) ou secundários (peça intermediária e caudas dobradas, persistência de gotas citoplasmáticas, alterações do colo espermático) (OTA, 2001; MORAIS, 1999).

O percentual de células espermáticas com acrossoma intacto foi avaliado em esfregaço corado pelo método descrito por POPE, ZHANG e DRESSER (1991), onde uma alíquota de 2  $\mu\text{l}$  de sêmen da segunda fração ejaculada era transferida para tubo de centrifuga (1,5 ml), contendo 10  $\mu\text{l}$  de corante a base de rosa-bengala e “fast-green”. Após dois minutos em temperatura ambiente, os esfregaços foram preparados em duplicata, a partir da solução já corada de espermatozóides. A avaliação dos mesmos foi feita sob imersão (1000 x) em microscopia óptica comum (OLYMPUS), avaliando-se um total de 200 células por esfregaço e classificando-se as células com acrossoma intacto (coloração azulada) ou acrossoma lesado ou ausente (coloração rosa claro).

#### 4.5 Criopreservação do sêmen

Para nutrir e manter a viabilidade espermática no período total necessário para completar a eletroejaculação, o sêmen foi diluído (1:1) em meio Ham-F10 enriquecido com 0,284 g/L de L-glutamina, 11 g/L de piruvato, 0,05 g/L de sulfato

de estreptomicina (VETEC Química Fina Ltda), 0,05 g/L de sal sódico de penicilina G e 5% soro fetal bovino (CULTILAB Materiais Para Cultura de Células Ltda) (HAM's). Após o término da colheita, as frações de sêmen foram combinadas e centrifugadas (300 g / 10 min.) para remoção do plasma seminal e do meio diluidor. O sedimento resultante (infranadante) foi homogeneizado com diluidor de congelamento, PDV-62/4 (gema de ovo 20% v:v, lactose 11%, p:v, glicerol 4%, v:v, 0,05 g/L de sulfato de estreptomicina (VETEC Química Fina Ltda), 0,05 g/L de sal sódico de penicilina G em água destilada ultrapura) em volume suficiente para atingir uma concentração entre 50 e 100 milhões de espermatozoides por mililitro. Após a diluição, a amostra foi dividida em duas alíquotas iguais em tubos de centrifuga (1,5 ml) submetidas, aleatoriamente, a um dos protocolos de resfriamento: rápido (SWANSON *et al.*, 1996b) ou lento (LENGWINAT e BLOTTNER, 1994). No método rápido de resfriamento o sêmen foi mantido em geladeira (4°C) por 30 minutos. No método lento, o tubo de centrifuga contendo a alíquota era imerso em recipiente plástico contendo 60 ml de água em temperatura ambiente e, a seguir, o conjunto era mantido em geladeira (4°C) por aproximadamente duas horas, até que a temperatura da água equilibrasse com a da geladeira.

Após o resfriamento, para qualquer um dos métodos, o sêmen era transferido com auxílio de pipeta automática de volume variável, em alíquotas de 30 µl, para depressões de aproximadamente 3 mm de diâmetro feitas em bloco de gelo seco (temperatura aproximada de 80°C negativos). Após 3 minutos os "pellets" eram imersos em nitrogênio líquido e envasados em tubos criogênicos estéreis devidamente identificados e mantidos em tanque de nitrogênio líquido até o descongelamento e análise.

#### 4.6 Descongelamento do sêmen e avaliação pós-descongelamento

Para o descongelamento, um "pellet" de cada amostra e tratamento foi transferido para tubo contendo 100 µl do meio HAM's a 37°C e incubado em

banho-maria a 37°C por 30 segundos. A seguir, a suspensão espermática foi centrifugada (300 g/10 min) para remoção do meio PDV-62/4 e HAM's, descartando-se o sobrenadante e rediluído o sedimento em 30 µl de meio HAM's.

Após o descongelamento, as amostras foram avaliadas, do mesmo modo descrito para o sêmen fresco, quanto a motilidade e vigor, para o cálculo do IME pós-descongelamento, concentração espermática (em câmara de hematimetria) e percentual de células com acrossoma intacto. Além disso, as amostras foram avaliadas para percentual de células viáveis por meio de citometria de fluxo. Para tanto, uma alíquota de volume variável, dependendo da concentração de espermatozóides, foi diluída com HAM's até atingir uma concentração final de  $2 \times 10^6$  espermatozóides/ml em um volume final de 500 µl, à qual foi adicionado 1 µl de iodeto de propídio (IP - 1 mg/ml). Após homogeneização, a solução foi incubada em câmara escura por 10 minutos, filtrada em membrana de nylon (20 µm) e avaliada em citômetro de fluxo (FACScalibur - Becton Dickinson), padronizado para contar 10 mil eventos (ou células) emissores de fluorescência vermelha (480 nm), para o corante IP. Os dados obtidos foram analisados por meio do Software CellQuest 3.0 (Becton Dickinson) e expressos como percentual de espermatozóides com membrana celular íntegra (não fluorescente) ou lesadas (fluorescência vermelha).

#### 4.7 Coleta dos ovócitos e maturação *in vitro*

Como fonte de ovócitos para os ensaios de fertilização *in vitro*, ovários de gatas domésticas foram obtidos após ovariectomia de fêmeas adultas que sofreram intervenção cirúrgica em clínicas veterinárias particulares e hospitais veterinários. Os ovários foram transportados ao laboratório em solução salina tamponada contendo 0,05 g/L de sulfato de estreptomicina (VETEC Química Fina Ltda) e 0,05 g/L de sal sódico de penicilina G. O prazo máximo estabelecido para a coleta dos ovócitos foi de seis horas após a intervenção cirúrgica (COMIZZOLI,

WILDT e PUKAZHENTHI, 2003; SPINDLER e WILDT, 1999). Porém em 80% das coletas, os ovócitos foram selecionados para maturação em aproximadamente três horas após a intervenção cirúrgica.

Com exceção de pequenas modificações, a maturação *in vitro* dos ovócitos foi realizada conforme descrito por ROTH et al. (1995), SPINDLER e WILDT (1999) e COMIZZOLI, WILDT e PUKAZHENTHI (2003). Em breve resumo, os ovários foram colocados em placas de Petri de 35 mm contendo meio essencial mínimo de Eagle com sal de Hank e L-glutamina (HMEM), suplementado com 4 g/L de albumina sérica bovina, 6 g/L de ácido hidroxietil piperazina etanosulfônico (HEPES), 0,05 g/L de sulfato de estreptomicina (VETEC Química Fina Ltda), 0,05 g/L de sal sódico de penicilina G. A seguir, foram submetidos à várias incisões com auxílio de uma lâmina de bisturi estéril para liberação dos complexos cúmulus-ovócitos (COCs). Sob ampliação de 32 vezes em estereomicroscópio (PZO – Labimex) e com auxílio de micropipeta de vidro (confeccionada a partir de um tubo capilar de microhematócrito aquecido em lamparina e esticado manualmente) os COCs foram selecionados e transferidos para outra placa contendo gotas de 100 µl de meio HMEM.

Numa primeira etapa, foram selecionados os COCs com citoplasma escuro e homogêneo, sem vacúolos citoplasmáticos e totalmente envolvidos por no mínimo duas camadas de células cúmulus, denominados COCs grau I (WOOD e WILDT, 1997; COMIZZOLI, WILDT e PUKAZHENTHI, 2003; JEWGENOW, comunicação pessoal). Os COCs grau I foram lavados três vezes, por meio de passagem em três gotas de meio HMEM, seguida de passagem em três gotas de meio de maturação (meio essencial mínimo de Eagle com sal de Earle e bicarbonato de sódio - MEM, suplementado com 0,292 g/L de L-glutamina, 4 g/L de albumina sérica bovina, 0,05 g/L de sulfato de estreptomicina (VETEC Química Fina Ltda), 0,05 g/L de sal sódico de penicilina G, 11 g/L de piruvato, 2 µg/ml de hormônio folículo estimulante (FSH) (Folltropin V, Vetrepharm Inc Canada, 2 µg/ml de hormônio luteinizante (LH) (Lutropin V, Bioniche Animal Health Canada Inc) e 2 µg/ml de β-Estradiol). Após isso, grupos de 10 a 20 COCs foram colocados em

gotas de 100  $\mu$ l de meio de maturação cobertas com óleo mineral lavado, ambos previamente equilibrados, em temperatura de 37°C, atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> em ar e máxima umidade, sendo incubados por 24 horas. Todo o processo entre incisão do ovário e colocação dos COCs grau I na incubadora levou entre 5 e 10 minutos.

Após esta etapa, foram coletados os COCs com citoplasma de coloração mais clara ou com presença de vacúolos, ou então que apresentam falhas discretas nas camadas de células cúmulus, COCs grau II (JEWGENOW, comunicação pessoal), sendo dispensado o mesmo tratamento aplicado aos COCs grau I quanto à lavagem e incubação. Finalmente, foram selecionados os ovócitos desnudos de boa qualidade que apesar de não estarem envolvidos pelas células cúmulus, apresentavam um citoplasma escuro e homogêneo, os quais foram colocados em placa de Petri de 35 mm de diâmetro com meio HMEM e armazenados em geladeira a 4°C por 24 horas (RINGLEB, ROHLER e JEWGENOW, 2004; JEWGENOW, comunicação pessoal).

#### 4.8 Remoção das células do cúmulus

Após 24 horas de incubação, os COCs foram colocados em placa de Petri de 35 mm de diâmetro contendo meio HMEM com 0,4% de hialuronidase (fórmula magistral), incubados a 37°C por 5 minutos (BYERS et al., 1994) e pipetados repetidas vezes para remover as células do cúmulus aderidas à zona pelúcida. Foram, a seguir, lavados em HMEM sem hialuronidase para remover os debris das células do cúmulus e, novamente, em meio HAM's.

Da mesma forma que os ovócitos desnudos, os ovócitos submetidos à maturação foram transferidos, em número de 5 a 10, para gotas de 40  $\mu$ l de meio HAM's cobertas por óleo mineral lavado e previamente equilibradas em temperatura de 37°C e atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> em ar. Para evitar choque

térmico após a maturação, as placas contendo os ovócitos foram manipuladas sobre placa aquecedora a 37° C.

#### 4.9 Ensaio de ligação espermática competitiva *in vitro*

Para avaliar se o método de resfriamento do sêmen criopreservado influenciou a capacidade dos espermatozoides se ligarem à zona pelúcida de ovócitos de gatas domésticas, um “pellet” de cada amostra, por tratamento, foi descongelado e avaliado conforme detalhado anteriormente. Após isso, as amostras foram diluídas para uma concentração de  $1 \times 10^6$  espermatozoides móveis/ml e um dos tratamentos (rápido ou lento) foi aleatoriamente corado com 0,1 µg/ml de bisbenzimidazolo (HOECHST), corante fluorescente vital, específico para DNA. Nas amostras subsequentes, dentro da espécie, ou na repetição de uma mesma amostra, alternou-se sucessivamente o tratamento a ser marcado com o fluoróforo.

Após a marcação de um dos tratamentos, uma alíquota de 5 µl da suspensão espermática de cada tratamento, por amostra, foi depositada nas gotas de 40 µl de meio HAM's contendo 5 a 10 ovócitos cada, as quais permaneceram em co-incubação por 18 horas em temperatura de 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> em ar e umidade máxima.

Ao final da co-incubação, os ovócitos foram lavados três vezes em meio HAM's para remover os espermatozoides frouxamente ligados na zona pelúcida do ovócito e depois foram colocados entre lâmina e lamínula de vidro. Utilizando-se microscópio de fluorescência (Fotomicroscópio Axiophot, Carl Zeiss – Germany), com filtro de 330 a 380 nm e ampliação de 200 vezes, foram contados os espermatozoides fluorescentes (tratamento corado) ligados na zona pelúcida. Após essa primeira contagem, com auxílio de uma pipeta automática, 20 µl de uma solução com 5 µg/ml do corante HOECHST foi injetada sob a lamínula, corando toda a população de espermatozoides. O número de espermatozoides

ligados à zona pelúcida foi contado novamente e, pela diferença entre primeira e segunda contagens, determinou-se o número de espermatozoides que se ligou à zona pelúcida referente ao tratamento não corada previamente.

Todas as imagens referentes às avaliações feitas foram adquiridas e armazenadas em sistema computacional acoplado ao microscópio, com auxílio do programa computacional Case Data Manager, para conferências posteriores.

#### 4.10 Avaliação da maturação *in vitro*

A eficiência do protocolo de maturação ovocitária *in vitro* foi avaliada com uma amostragem de ovócitos de cada procedimento (10 a 20%). Após a remoção das células do cúmulus, os ovócitos destinados a este fim, foram fixados em 500  $\mu$ l de paraformaldeído 2% e Triton-X 0,04% por 45 minutos a 37°C (SPINDLER e WILDT, 1999; RINGLEB, ROHLER e JEWGENOW, 2004; JEWGENOW, comunicação pessoal). Na seqüência, foram corados com 5  $\mu$ g/ml de HOECHST em 500  $\mu$ l de meio HMEM por 10 minutos a 37°C (JEWGENOW, comunicação pessoal) e montadas as lâminas para avaliação em microscópio de fluorescência. O estágio do ciclo meiótico foi visualizado e foram considerados maduros os ovócitos em metáfase II (SPINDLER e WILDT, 1999; JEWGENOW, comunicação pessoal).

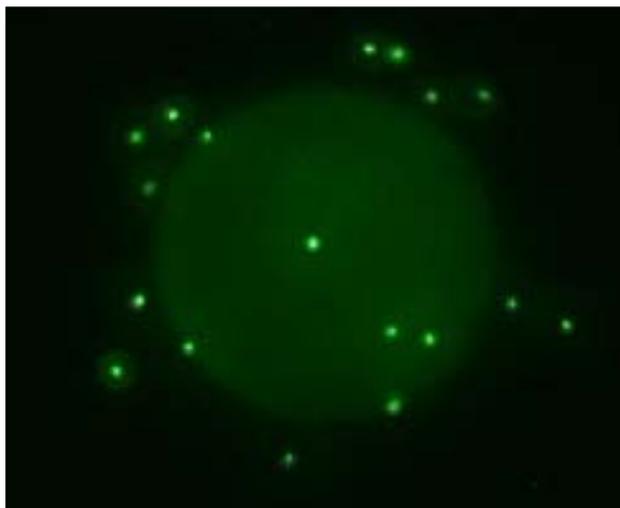


FIGURA 1 – FOTOMICROGRAFIA DE OVÓCITO DE GATA DOMÉSTICA E ESPERMATOZÓIDES DE JAGUATIRICA EM ENSAIO DE LIGAÇÃO ESPERMÁTICA, CORADOS COM HOECHST. A FLUORESCÊNCIA REFERE-SE AO DNA ESPERMÁTICO - AUMENTO 200 X

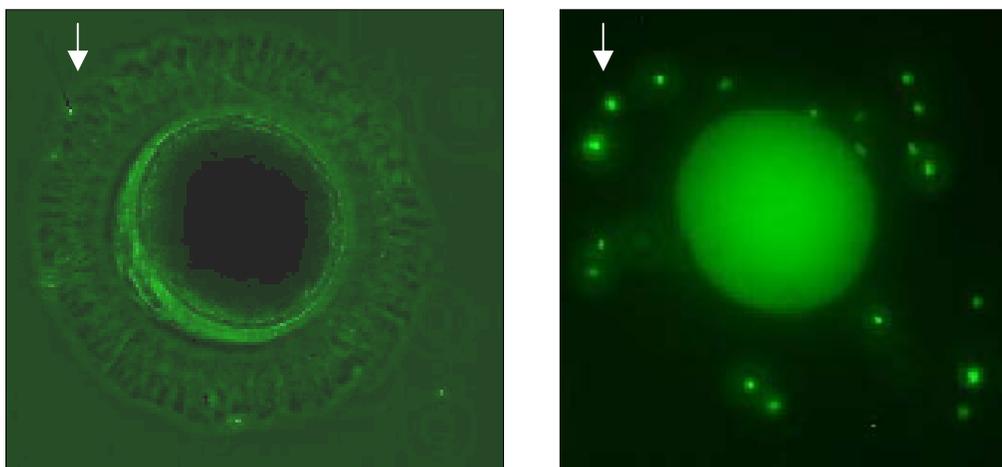


FIGURA 2 E 3 – FOTOMICROGRAFIA DE OVÓCITO DE GATA DOMÉSTICA E ESPERMATOZÓIDES DE GATO-DO-MATO-PEQUENO EM ENSAIO DE LIGAÇÃO ESPERMÁTICA, CORADOS COM HOECHST. A FLUORESCÊNCIA REFERE-SE AO DNA ESPERMÁTICO E A SETA INDICA A PENETRAÇÃO DE UM ESPERMATOZÓIDE - AUMENTO 200 X

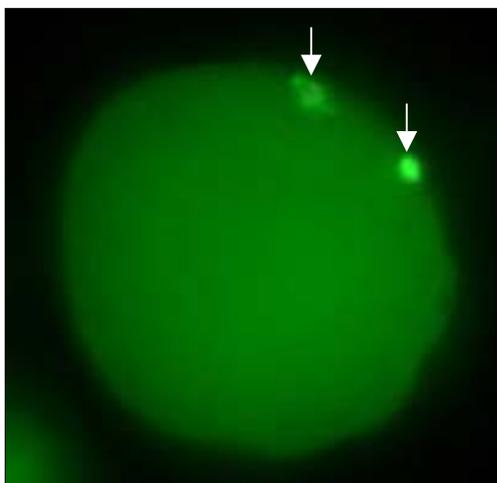


FIGURA 4 – FOTOMICROGRAFIA DE OVÓCITO DE GATA DOMÉSTICA MATURADO *IN VITRO*, CORADO COM HOECHST. AS SETAS INDICAM O FUSO MITÓTICO (METÁFASE II) - AUMENTO 200 X



FIGURA 5 – FOTOMICROGRAFIA DE OVÓCITO DE GATA DOMÉSTICA IMATURO, CORADO COM HOECHST. A SETA INDICA A QUEBRA DA VESÍCULA GERMINATIVA - AUMENTO 200 X

## 5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram calculadas as médias e medida de dispersão para cada variável estudada. Diferenças entre tratamentos e/ou espécie para as características do sêmen foram testadas por ANOVA, seguida de teste de Duncan. Para os ensaios de ligação espermática, diferenças entre os tratamentos, dentro da mesma espécie, foram verificadas por análise não paramétrica, utilizando-se o teste Mann-Whitney. As diferenças foram consideradas significativas para um alfa de 5%.

Foram também calculados os coeficientes de correlação entre as características do sêmen após o descongelamento com os resultados do ensaio de ligação espermática *in vitro*.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Características do sêmen pré e pós-descongelamento

No total foram colhidas 58 amostras de sêmen, sendo sete amostras de sêmen de gato-do-mato-pequeno ( $n = 4$ ), seis amostras de sêmen de jaguatirica ( $n = 3$ ) e 45 amostras de gato doméstico ( $n = 15$ ), sendo  $n$  igual ao número de animais de cada espécie. Destas, 26 amostras apresentaram quantidade e qualidade para permitir o congelamento pelos dois métodos de resfriamento. As demais amostras ou não foram congeladas ou apenas permitiram congelamento por um dos métodos, não tendo sido, portanto, utilizadas para comparar os dois tratamentos de resfriamento.

Todas as amostras de sêmen de jaguatirica colhidas neste experimento apresentaram contaminação do sêmen com urina durante o processo de eletroejaculação.

Os valores médios para o sêmen fresco, para as três espécies estão resumidos na TABELA 1, diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as espécies foi observada apenas para o volume do ejaculado e para a morfologia, com o gato doméstico apresentando o menor valor entre as três.

Na avaliação do sêmen após o descongelamento, para os dois tratamentos utilizados, o IME observado variou entre 35 e 55% para o gato-do-mato-pequeno e jaguatirica, e de 40 a 65% para o gato doméstico. Os valores médios, por tratamento e por espécie são apresentados na TABELA 2. Diferença significativa foi observada para todas as espécies entre o sêmen fresco e o descongelado, independente do tratamento utilizado, porém, as comparações dos resultados pós-descongelamento, entre tratamentos, para cada espécie ou entre espécies não evidenciou diferenças significativas.

Do mesmo modo houve redução significativa no percentual de células com acrossoma intacto do sêmen fresco para as amostras pós-descongelamento em todas as espécies, independente do tratamento. O congelamento causou

grande impacto sobre a integridade do acrossoma que reduziu 65% em gato-do-mato-pequeno e gato doméstico e 78% em jaguatirica. Comparando-se os valores pós-descongelamento, por tratamento, não foram detectadas diferenças significativas, porém, entre espécies, o resfriamento lento teve um efeito negativo maior em jaguatiricas. Valores médios por espécie e tratamento estão resumidos na TABELA 2.

O percentual de células viáveis diferiu significativamente entre os tratamentos, com um maior valor médio para as amostras congeladas pelo método rápido em gato-do-mato-pequeno e, pelo método lento em jaguatiricas. Nos gatos domésticos, os valores obtidos nos dois métodos de resfriamento não diferiram significativamente. Comparando as espécies entre si, independente do tratamento, o percentual de viabilidade em gato-do-mato-pequeno foi maior ( $p < 0,05$ ) do que nas demais espécies (TABELA 2).

TABELA 1 – MÉDIA ( $\pm$  ERRO PADRÃO DA MÉDIA) DAS CARACTERÍSTICAS DO SÊMEN DE GATO-DO-MATO-PEQUENO (*Leopardus tigrinus*), JAGUATIRICA (*L. pardalis*) E GATO DOMÉSTICO (*Felis catus*)

	Gato-do-mato-pequeno ( <i>L. tigrinus</i> )	Jaguaririca ( <i>L. pardalis</i> )	Gato Doméstico ( <i>Felis catus</i> )
Volume de sêmen (ml)	0,35 $\pm$ 0,12 <sup>ab</sup>	0,66 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup>	0,16 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>
Concentração espermática (x 10 <sup>6</sup> /ml)	242,8 $\pm$ 85,2	190,2 $\pm$ 73,2	201,6 $\pm$ 26,6
Total de espermatozóides/ ejaculado (x 10 <sup>6</sup> )	56,6 $\pm$ 14,4	107,0 $\pm$ 42,2	33,4 $\pm$ 4,7
Motilidade espermática (%)	78,9 $\pm$ 1,5	81,0 $\pm$ 3,2	75,6 $\pm$ 1,3
Vigor (0 – 5)	3,9 $\pm$ 0,1	3,7 $\pm$ 0,2	3,7 $\pm$ 0,1
IME (%)	80,0 $\pm$ 2,0	76,0 $\pm$ 8,5	78,5 $\pm$ 1,7
Acrossoma (%)	91,0 $\pm$ 5,0	94,0 $\pm$ 0,7	92,3 $\pm$ 0,9
Morfologia (%)	76,8 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>	78,0 $\pm$ 2,7 <sup>a</sup>	51,6 $\pm$ 9,4 <sup>b</sup>
Defeitos primários (%)	10,8 $\pm$ 2,7	4,3 $\pm$ 0,7	8,2 $\pm$ 1,4
Defeitos secundários (%)	17,3 $\pm$ 6,5	18,7 $\pm$ 0,7	37,7 $\pm$ 3,7

IME = Índice de motilidade espermática = [% motilidade + (20 x vigor) ] /2

Acrossoma = percentual de espermatozóides com acrossoma intacto

Morfologia = percentual de espermatozóides normais

a,b = indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para a característica entre as espécies

TABELA 2 - ÍNDICES MÉDIOS ( $\pm$  ERRO PADRÃO DA MÉDIA) DE MOTILIDADE ESPERMÁTICA, ACROSSOMA, MORFOLOGIA E VIABILIDADE DE SÊMEN FRESCO E CRIOPRESERVADO DE GATO-DO-MATO-PEQUENO (*Leopardus tigrinus*), JAGUATIRICA (*Leopardus pardalis*) e GATO DOMÉSTICO (*Felis catus*)

		SÊMEN FRESCO	SÊMEN RESFRIAMENTO RÁPIDO	CRIOPRESERVADO RESFRIAMENTO LENTO
GATO-DO- MATO- PEQUENO ( <i>L. tigrinus</i> ) (n = 7)	IME	80,0 $\pm$ 2,0 <sup>a</sup>	51,0 $\pm$ 4,0 <sup>b</sup>	49,0 $\pm$ 2,9 <sup>b</sup>
	ACROSSOMA	91,0 $\pm$ 5,0 <sup>a</sup>	30,8 $\pm$ 5,6 <sup>b</sup>	33,4 $\pm$ 2,2 <sup>b(a)</sup>
	MORFOLOGIA	76,8 $\pm$ 0,9	NA	NA
	VIABILIDADE	NA	51,2 $\pm$ 2,3 <sup>a(a)</sup>	44,0 $\pm$ 3,5 <sup>b(a)</sup>
JAGUATIRICA ( <i>L. pardalis</i> ) (n = 6)	IME	76,0 $\pm$ 8,5 <sup>a</sup>	50,0 $\pm$ 1,8 <sup>b</sup>	49,2 $\pm$ 3,0 <sup>b</sup>
	ACROSSOMA	94,0 $\pm$ 0,7 <sup>a</sup>	21,6 $\pm$ 3,5 <sup>b</sup>	19,8 $\pm$ 3,2 <sup>b(b)</sup>
	MORFOLOGIA	78,0 $\pm$ 2,7	NA	NA
	VIABILIDADE	NA	24,0 $\pm$ 1,3 <sup>a(b)</sup>	27,4 $\pm$ 1,4 <sup>b(b)</sup>
GATO DOMÉSTICO ( <i>F. catus</i> ) (n = 13)	IME	78,5 $\pm$ 1,7 <sup>a</sup>	53,1 $\pm$ 3,2 <sup>b</sup>	49,2 $\pm$ 2,5 <sup>b</sup>
	ACROSSOMA	92,3 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>	33,4 $\pm$ 2,3 <sup>b</sup>	32,7 $\pm$ 1,9 <sup>b(a)</sup>
	MORFOLOGIA	51,6 $\pm$ 9,4 <sup>(a)</sup>	NA	NA
	VIABILIDADE	NA	28,6 $\pm$ 2,0 <sup>(b)</sup>	28,2 $\pm$ 2,0 <sup>(b)</sup>

IME = Índice de Motilidade Espermática

ACROSSOMA = percentual de células com acrossoma intacto

MORFOLOGIA = percentual de células normais

VIABILIDADE = percentual de células com integridade da membrana celular

n = número de ejaculados

a,b = indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre tratamentos

(a,b) = indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as espécies dentro do tratamento

NA = não avaliado

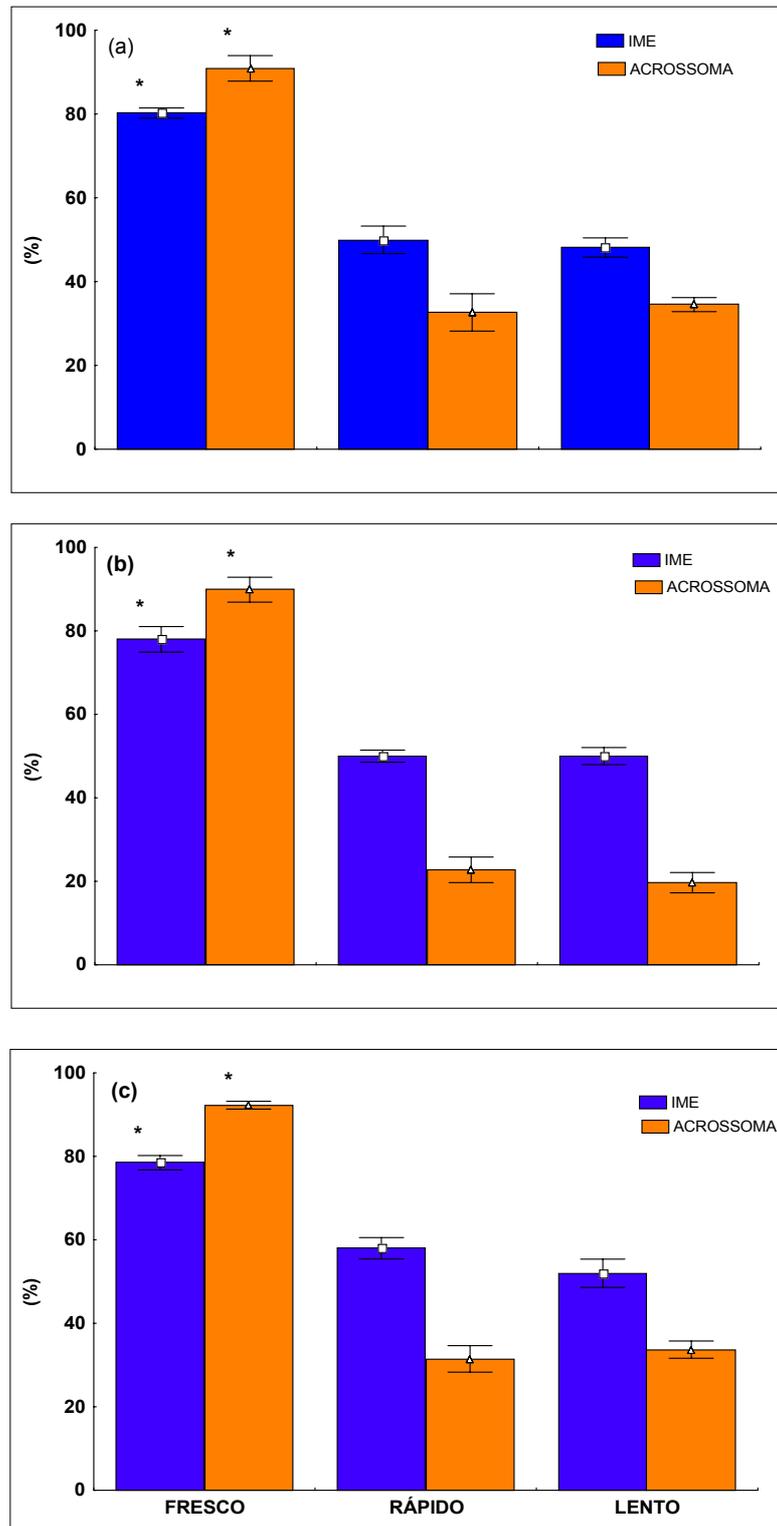


FIGURA 6 - ÍNDICES MÉDIOS ( $\pm$  ERRO PADRÃO DA MÉDIA) DA MOTILIDADE ESPERMÁTICA E ACROSSOMA DE SÊMEN FRESCO E CRIOPRESERVADO DE (a) GATO-DO-MATO-PEQUENO (*Leopardus tigrinus*), (b) JAGUATIRICA (*Leopardus pardalis*) E (c) GATO DOMÉSTICO (*Felis catus*)

## 6.2 Maturação ovocitária *in vitro*

Ao longo de todo o experimento, incluindo a fase de treinamento de técnicas, foram utilizados ovários de 43 gatas domésticas. Destes 86 ovários, foram coletados 390 ovócitos classificados em grau I (39,2%), 418 em grau II (42%) e 187 desnudos (18,2%). Do total de 808 ovócitos grau I e II submetidos a maturação *in vitro*, uma amostra de 19% (156 ovócitos) foi utilizada para avaliação da taxa de maturação, cujo valor médio geral foi de 70% (TABELA 3).

TABELA 3 – NÚMERO DE OVÓCITOS COLETADOS DOS OVÁRIOS DE 43 GATAS DOMÉSTICAS E TAXA DE MATURAÇÃO MÉDIA ( $\pm$  ERRO PADRÃO DA MÉDIA) PARA OVÓCITOS GRAU I E II

	Ovócitos Grau I	Ovócitos Grau II	Ovócitos Desnudos
Nº ovócitos coletados	390 (39%)	418 (42%)	187 (19%)
Nº ovócitos /gata	9,1 $\pm$ 1,4	9,7 $\pm$ 1,4	4,3 $\pm$ 4,3
% maturação <i>in vitro</i>	74 $\pm$ 3,4 n = 73 (19%)	67 $\pm$ 3,3 n = 83 (20%)	

Foram considerados maduros os ovócitos em metáfase II;  
n = número de ovócitos avaliados

## 6.3 Ensaios de ligação espermática competitiva *in vitro*

Um total de 31 ensaios de ligação espermática foram realizados no presente estudo e, em apenas 16 (51,6%) a taxa de ligação espermática foi significativamente diferente de zero. Dos ensaios falhos, cinco foram observados para amostras de sêmen de um macho de jaguatirica, cuja qualidade espermática pós-descongelamento estava semelhante à dos outros machos, porém não houve ligação espermática significativa. Outros 10 ensaios com ligação praticamente nula ocorreram em uma única semana de experimento, com amostras de sêmen de jaguatirica e gato doméstico que apresentaram boa qualidade pós-descongelamento, inclusive com algumas amostras sendo avaliadas em repetição de ensaios anteriores com bons resultados.

Analisando os ensaios eficazes, constatou-se que não houve diferença significativa na taxa de ligação espermática entre os ovócitos grau I e II e, sendo assim, os resultados dos mesmos foram combinados para avaliação estatística de todos os ensaios (TABELA 4).

Considerando ovócitos grau I e II e sêmen de gato-do-mato-pequeno, o número médio de espermatozóides ligados por ensaio foi de  $38,8 \pm 7,0$  para o sêmen resfriado rápido e  $84,0 \pm 17$  para o tratamento com sêmen resfriado lentamente. Já para jaguatirica e gato doméstico, os maiores valores foram observados para o sêmen resfriado rapidamente, com um valor médio de  $81,1 \pm 27,8$  e  $25,2 \pm 5$  espermatozóides ligados por ensaio no método rápido, respectivamente, e  $23,3 \pm 8,4$  e  $7,6 \pm 0,9$  no método lento.

Os valores médios da taxa de ligação espermática por ovócito, por tratamento e por espécie são apresentados na TABELA 4. Diferenças significativas foram observadas entre os tratamentos para as três espécies. Para as amostras de sêmen dos felinos selvagens, a maioria dos ensaios foi repetida para uma mesma amostra, obtendo-se um coeficiente de variação de 5% entre os ensaios.

Nenhuma correlação significativa foi encontrada entre o número de espermatozóides ligados por ovócito e as características do sêmen pós-descongelamento como índice de motilidade espermática, percentual de acrossoma intacto e viabilidade ou com o percentual de células morfológicamente normais do sêmen fresco.

TABELA 4 – TAXA MÉDIA ( $\pm$  ERRO PADRÃO DA MÉDIA) DE OVÓCITOS DE GATA DOMÉSTICA LIGADOS E ÍNDICE MÉDIO ( $\pm$  ERRO PADRÃO DA MÉDIA) DA LIGAÇÃO ESPERMÁTICA DE SÊMEN CRIOPRESERVADO DE GATO-DO-MATO-PEQUENO (*Leopardus tigrinus*), JAGUATIRICA (*Leopardus pardalis*) E GATO DOMÉSTICO (*Felis catus*) NOS ENSAIOS UTILIZANDO OVÓCITOS DE GATA DOMÉSTICA

	OVÓCITOS GRAU I E II			OVÓCITOS DESNUDOS		
	Nº total de ovócitos	Taxa de ovócitos ligados (%)	Nº espermatozóides /ovócito	Nº total de ovócitos	Taxa de ovócitos ligados (%)	Nº espermatozóides /ovócito
Gato do mato pequeno (n = 5)						
Resfriamento rápido	74	96,6 $\pm$ 2,2	2,7 $\pm$ 0,4 *	19	90,3 $\pm$ 9,7	4,2 $\pm$ 1,3
Resfriamento lento	74	96,6 $\pm$ 2,2	5,8 $\pm$ 0,9	19	90,3 $\pm$ 9,7	6,1 $\pm$ 1,8
Jaguaririca (n = 6)						
Resfriamento rápido	70	97,2 $\pm$ 1,8	8,5 $\pm$ 1,3 **	17	85,7 $\pm$ 14,3	23,6 $\pm$ 12,0
Resfriamento lento	70	97,2 $\pm$ 1,8	2,5 $\pm$ 0,3	17	76,3 $\pm$ 23,4	5,4 $\pm$ 2,8
Gato doméstico (n = 5)						
Resfriamento rápido	38	80,4 $\pm$ 10,4	4,3 $\pm$ 0,9 *	10	41,5 $\pm$ 8,5	3,3 $\pm$ 2,5
Resfriamento lento	38	77,4 $\pm$ 9,1	1,4 $\pm$ 0,2	10	50,0 $\pm$ 0,0	2,0 $\pm$ 1,4

\* indica diferença significativa ( $p < .05$ ) entre tratamentos dentro da espécie

\*\* indica diferença significativa ( $p < .01$ ) entre tratamentos dentro da espécie

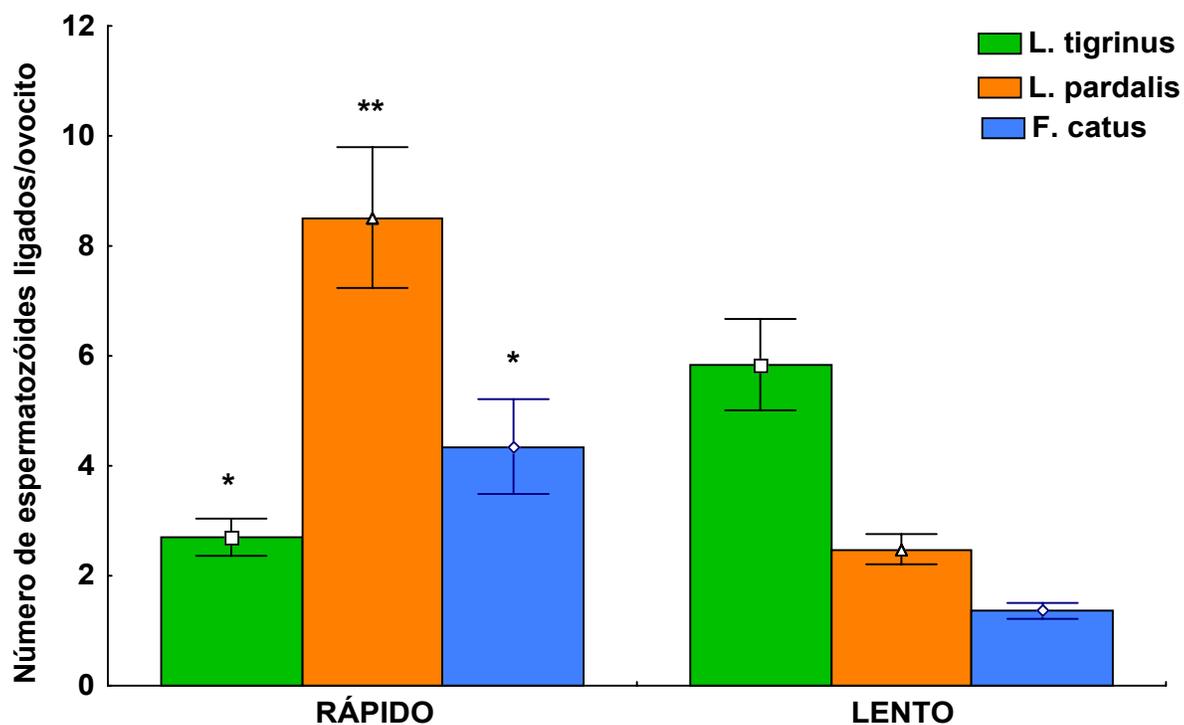


FIGURA 7 - ÍNDICE MÉDIO ( $\pm$  ERRO PAFRÃO DA MÉDIA) DA LIGAÇÃO ESPERMÁTICA DE SÊMEN CRIOPRESERVADO DE GATO-DO-MATO-PEQUENO (*Leopardus tigrinus*), JAGUATIRICA (*Leopardus pardalis*) E GATO DOMÉSTICO (*Felis catus*) \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$

## 7. DISCUSSÃO

As características do ejaculado a fresco estão muito próximas dos valores reportados na literatura para estas espécies, sendo considerados ejaculados de alta qualidade, com exceção da morfologia espermática em gatos domésticos, conforme dados anteriores do próprio laboratório (OTA, 2001) e de outros autores (HOWARD, BUSH e WILDT, 1991; PUKAZHENTHI *et al.*, 2000). Em relação às características do sêmen fresco não foram encontradas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as espécies, exceto para volume do ejaculado e morfologia. No presente estudo, o sêmen de gato-do-mato-pequeno apresentou 76,8% de células normais, contrariando SWANSON *et al* (2003) que observaram alto percentual de espermatozóides anormais para esta espécie. Isto é um dado importante para os indivíduos estudados já que a teratospermia está relacionada com variabilidade genética limitada (PUKAZHENTHI *et al*, 2001; SWANSON *et al*, 2003). MORAIS *et al* (2002) reportam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) para concentração e motilidade espermáticas, e para defeitos primários e secundários no sêmen de jaguatirica e gato-do-mato-pequeno. A dissemelhança entre os valores encontrados provavelmente se deve ao pequeno número de amostras analisadas no presente estudo em relação a outras citações (MORAIS *et al*, 2002).

De acordo com a bibliografia pesquisada, este é provavelmente o primeiro experimento testando estes dois métodos de resfriamento do sêmen pré-congelamento para o gênero *Leopardus*. Para o gato doméstico, o protocolo é descrito para sêmen epididimário (LENGWINAT e BLOTNER, 1994) e apenas o resfriamento, não seguido de congelamento, foi realizado por PUKAZHENTHI *et al.* (1999). Pelos dados de PUKAZHENTHI *et al.* (1999), o método lento de resfriamento, ainda que as amostras não tenham sido congeladas na seqüência, mostrou-se menos agressivo em relação à danos causados no acrossoma. Os métodos de resfriamento rápido e lento também foram utilizados para a criopreservação de sêmen de leopardo nebuloso (*Neofelis nebulosa*) (PUKAZHENTHI *et al.*, 2004). Comparando os dois tratamentos, os autores

observaram resultados similares ( $p > 0,05$ ) para motilidade espermática, assim como para o percentual de espermatozóides com acrossoma intacto ( $p < 0,05$ ) na avaliação pós-descongelamento, de modo similar ao observado neste estudo.

Os valores médios de IME e a redução deste índice entre sêmen fresco e congelado, para ambos os tratamentos, foram inferiores aos valores observados por MORAIS (2001) para jaguatirica e gato-do-mato-pequeno. A redução no IME entre sêmen fresco e congelado é esperada porque a motilidade espermática é muito sensível à mudanças na osmolaridade do meio durante os processos de congelamento e descongelamento. A variação entre os dados observados por MORAIS (2001) e aqui relatados pode ocorrer porque indivíduos da mesma espécie podem apresentar diferentes graus de sensibilidade à mudanças na temperatura (PUKAZHENTHI *et al.*, 2000; 2002). Não houve diferença significativa entre as médias encontradas para o IME de sêmen de gato doméstico, para os dois tratamentos de resfriamento testados. Entretanto, os valores aqui observados foram superiores aos índices relatados por ZAMBELLI, CANEPPELE e CASTAGNETTI (2002) e OTA (2001) para o mesmo meio crioprotetor e velocidade de resfriamento rápida.

Espera-se encontrar redução nos valores de acrossoma intactos entre o sêmen fresco e pós-descongelamento (ver TABELA 2) porque a criopreservação é considerada um processo artificial de capacitação devido às baixas temperaturas de estocagem (POPE, ZHANG e DRESSER, 1991). Para os dois tratamentos testados em sêmen de gato doméstico e gato-do-mato-pequeno, o percentual de espermatozóides com acrossoma intacto foi superior aos valores encontrados por ZAMBELLI, CANEPPELE e CASTAGNETTI (2002) e por LENGWINAT e BLOTNER (1994) em sêmen de gato doméstico. Porém, o resfriamento lento do sêmen mostrou ter um maior efeito prejudicial para o percentual de acrossomas intactos em sêmen de jaguatirica. De acordo com MORAIS (2001), um dos fatores que pode contribuir para a redução no percentual de espermatozóides com acrossoma intacto é a contaminação da amostra por urina, e que, no presente estudo, foi observada em todos os ejaculados desta espécie. Esta contaminação

pode ser, em parte, decorrente do protocolo anestésico utilizado, já que o cloridrato de xilazina, medicamento  $\alpha$  agonista de ação central e periférica, inibe a liberação do hormônio antidiurético (ADH) e reduz a osmolaridade da urina, aumentando o débito urinário (THURMON, TRANQUILLI e BENSON, 1996). A musculatura lisa do esfíncter uretral interno possui receptores  $\alpha$  enquanto no músculo detrusor da parede da bexiga urinária estão os receptores  $\beta$  (VANDER, SHERMAN e LUCIANO; 2001). Após a administração dos fármacos, a xilazina liga-se aos receptores  $\alpha$  do esfíncter uretral interno, promovendo o relaxamento desta estrutura. Portanto, dependendo da sensibilidade do animal ou do grau de estímulo efetuado pela descarga elétrica do eletroejaculador, a urina pode ser eliminada juntamente com o sêmen. Para as três espécies foi utilizada a mesma dose de cloridrato de xilazina, porém, em jaguatiricas, por mecanismos que podem incluir diferenças anatômicas e/ou metabólicas, esta medicação pode causar um relaxamento muscular de efeito mais intenso, justificando a maior contaminação do sêmen com urina nestes animais.

PUKAZHENTHI *et al.*, (1999) relataram que o resfriamento lento promove um menor índice de lesão de acrossoma para sêmen de gato doméstico, porém em nossos resultados não houve diferença percentual de acrossomas intactos entre os dois tratamentos para esta espécie provavelmente porque na pesquisa de PUKAZHENTHI *et al.* (1999) o sêmen não sofreu os efeitos do congelamento. PUKAZHENTHI *et al.* (2004) observaram resultados similares, entre os métodos de resfriamento rápido e lento, para o percentual de espermatozóides com acrossoma intacto de sêmen de leopardo nebuloso. No presente estudo, igual similaridade ( $p > 0,05$ ) foi observada entre os tratamentos rápido e lento para os dados de acrossoma.

Para a característica percentual de células viáveis, os resultados observados entre os tratamentos diferiram somente para o gênero *Leopardus*, sendo que o método de resfriamento rápido proporcionou um maior percentual de células viáveis para o gato-do-mato-pequeno, enquanto o método de resfriamento lento se mostrou mais eficaz para a jaguatirica. Na literatura não encontramos

valores de referência para estas espécies, mas PUKAZHENTI *et al.* (2002) em estudos sobre o efeito da adição e remoção do crioprotetor ao sêmen de gato doméstico, observou um intervalo de variação de 12,7% a 99,2% no percentual de células com membrana plasmática íntegra, o que pode justificar os dados aqui referidos. Utilizando o mesmo corante, KIRK (2001) observou 44% de células viáveis para sêmen de eqüinos e PEÑA *et al.* (1999) obtiveram resultados entre 58 a 65 % de células viáveis para sêmen de cães no pós-descongelamento, porém para estas duas espécies foram utilizados diferentes protocolos de criopreservação e técnicas de coloração das amostras.

A variação observada nas características do sêmen avaliadas para as três espécies, entre este e estudos prévios realizados neste laboratório, podem ser devidas ao fato de terem sido avaliados indivíduos diferentes dos outros estudos, exceto por um macho de *L. tigrinus* e também pela variação individual e pelas diferentes condições de manutenção destes animais. As espécies selvagens são mantidas cativas em três instituições distintas e sujeitas a diversos fatores de estresse como visitação pública, manejo pelos tratadores, contato com outros animais e, portanto, sujeitas à maior variação individual. Também o número de amostras avaliadas por espécie e por indivíduo foi menor do que o número considerado nos outros relatos.

O número médio de COCs coletados por ovário está de acordo com os valores encontrados na literatura, mas alguns pesquisadores relatam números expressivamente mais altos (LOPES, 2002) ou mais baixos COMIZZOLI, WILDT e PUKAZHENTI (2003) e SPINDLER e WILDT (1999). Para FREISTEDT, STOJKOVIC e WOLF (2001), que relataram números semelhantes aos observados neste estudo, o principal motivo dos diferentes valores encontrados é a diferença nos critérios de seleção dos COCs. Para SPINDLER e WILDT (1999), o período reprodutivo de coleta dos ovários, que é influenciado pelo clima, também afeta o número de ovócitos coletados por doadora.

A taxa de maturação de 70% encontrada para todos os ovócitos avaliados, é um valor intermediário aos valores de 10 a 65% (incluindo variações

sazonais) encontrados por SPINDLER E WILDT (1999) e a taxa de 77,3% observada por RINGLEB, ROHLER e JEWGENOW (2004). Percentuais inferiores foram relatados por LOPES (2002) que também referiu uma taxa de coleta de 42,3 COCs por gata e estes valores explicam a influência negativa do critério de seleção na taxa de maturação. Segundo WOOD *et al.* (1997), o critério aqui utilizado de seleção dos complexos cúmulus-ovócitos baseado na morfologia promove a seleção de populações, que apesar de aparentemente homogêneas, podem ter uma alta heterogeneidade funcional de ovócitos, com um número significativo desses ovócitos podendo estar parcialmente em atresia.

Além do critério de seleção, outros fatores podem afetar a taxa de maturação, tendo importância fundamental o estado nutricional da doadora, pois SWANSON *et al.* (2002) observaram que fêmeas de jaguatirica e gato-do-mato-pequeno que receberam dieta alimentar com suplementação vitamínica e mineral forneceram ovócitos de melhor qualidade e apresentaram, por sua vez, um maior índice de fertilização, do que as fêmeas mantidas com dietas inadequadas, reforçando a importância da nutrição para a reprodução. Apesar deste estudo não ter identificado as diferentes fases reprodutivas em que as fêmeas se encontravam no momento da coleta dos ovócitos, não houve uma variação significativa nas taxas de maturação entre os ovócitos das diferentes doadoras. O período de coleta dos ovócitos neste estudo concentrou-se nos meses de primavera e verão, com maior fotoperíodo, descartando o efeito do impacto da variação circanual na qualidade dos ovócitos de gato doméstico relatado por SPINDLER e WILDT (1999), explicando assim a regularidade observada na maturação dos ovócitos.

O método de avaliação da maturação dos ovócitos foi similar ao utilizado por autores como RINGLEB, ROHLER e JEWGENOW (2004) e SPINDLER e WILDT (1999) e recomendado pessoalmente por JEWGENOW, e mostrou-se eficiente para os fins desejados. No experimento realizado, não foi possível checar a maturação de cada ovócito que participou do ensaio de ligação, sendo que para fins de aferição do índice de maturação, um percentual de

ovócitos de cada ensaio foi fixado e corado segundo os autores acima citados. A impossibilidade de se avaliar ao mesmo tempo a maturação e a ligação espermática ocorreu pela necessidade do segundo procedimento de coloração dos espermatozóides conforme descrito nos métodos aplicados. No período de treinamento de técnicas observamos que após a primeira avaliação do número de espermatozóides ligados, a membrana plasmática dos ovócitos rompia permitindo o extravasamento do citoplasma, dificultando a segunda contagem e a observação da fase de maturação. Segundo DOMINKO *et al.* (2000), a exposição dos ovócitos aos raios UV do microscópio de fluorescência, por período superior a 30 segundos, é responsável pela perda da integridade da membrana, conforme foi observado.

Para este experimento os métodos de seleção dos COCs e avaliação da maturação dos ovócitos foi plenamente eficiente, porém, a despeito dos fatores que modulam a qualidade do ovócito, SPINDLER e WILDT (1999b) citaram que os marcadores de maturação citoplasmática são indicadores mais confiáveis da capacidade de desenvolvimento do que a observação do disco meiótico. Esses autores, utilizando ensaios de fertilização *in vitro* com observação de clivagem e formação de blastocisto, concluíram que a capacidade de desenvolvimento do ovócito não é acompanhada pela maturação nuclear e receptividade da zona, sugerindo que o método de observação da metáfase II nem sempre reflete a maturação citoplasmática nestas espécies. E, por este motivo, sugerem que os marcadores metabólicos são o meio mais eficaz para seleção de ovócitos de felinos (SPINDLER e WILDT, 1999).

Em experimentos de ligação espermática em ovócitos, tanto a maturação nuclear e citoplasmática assim como as transformações bioquímicas que a zona sofre para se tornar mais receptiva aos espermatozóides são fundamentais para a eficácia dos ensaios. O uso dos ovócitos desnudos nestes ensaios é justificado porque provavelmente este tipo de ovócito foi submetido à maturação fisiológica *in vivo* e, portanto têm alto potencial para se ligar aos espermatozóides. Assim como foi relatado por RINGLEB, ROHLER e JEWGENOW (2004), as taxas de

ligação espermática observadas neste estudo foram similares entre ovócitos desnudos e aqueles maturados *in vitro*, sugerindo ser possível o uso dos ovócitos desnudos para ensaios de ligação espermática como uma alternativa prática e menos dispendiosa do que os ovócitos maturados *in vitro*.

Inúmeras são as variáveis que limitam a comparação entre os experimentos com este tipo de ensaio entre os diversos autores, as quais incluem diferenças nos meios de cultura e suplementos utilizados no ensaio, nas características do sêmen testado e nos diferentes tratamentos a que este foi submetido, diferenças nos critérios de seleção dos ovócitos e nos sistemas de cultivo e até mesmo nos instrumentos de manipulação celular como as pipetas. Por exemplo, os resultados das taxas de ligação espermática aqui observados são similares aos valores relatados por ANDREWS *et al.* (1992), em ensaios com sêmen de gato doméstico e gato-leopardo, porém inferiores ao citados por alguns autores como HOWARD, BUSH e WILDT (1991), ROTH, SWANSON e WILDT (1994) e RINGLEB, ROHLER e JEWGENOW (2004). Entretanto, a maioria dos estudos prévios utilizando ensaios de ligação espermática foram conduzidos em temperaturas de 38°C a 39°C (WOOD *et al.*, 1995; SPINDLER e WILDT, 1999; COMIZZOLI, WILDT e PUKAZHENTHI, 2003; HOWARD *et al.*, 1993; RINGLEB, ROHLER e JEWGENOW, 2004). No presente experimento, a incubadora disponível para o cultivo celular não é de uso exclusivo para gametas, e os procedimentos de maturação dos ovócitos bem como os ensaios de competição espermática foram conduzidos em temperatura de 37°C.

SINOWATZ *et al.* (2003) afirmaram que, mais do que uma ligação específica fisiológica, a força de adesão da ligação espermática reflete a área de contato entre a cabeça do espermatozóide e a zona pelúcida, portanto, outro fator que pode ter afetado o resultado da taxa de ligação espermática é o diâmetro da pipeta utilizada para liberar os espermatozóides frouxamente aderidos à zona pelúcida na lavagem dos ovócitos após o ensaio. Isto se explica porque as pipetas são confeccionadas manualmente e, portanto, apresentam discretas variações em seu diâmetro interno, podendo ser mais ou menos eficazes na remoção dos

espermatozóides frouxamente ligados. Na avaliação do ensaio de ligação espermática de sêmen canino em ovócitos homólogos, STRÖM-HOLST *et al.* (2000) observaram que após a lavagem suave utilizando pipeta de maior diâmetro, os ovócitos apresentavam um número maior de espermatozóides ligados em relação à lavagem vigorosa, com pipeta de diâmetro menor. Entretanto, uma das vantagens do ensaio utilizado no presente estudo, com ligação espermática competitiva, é que ambas as populações testadas estão ligadas nos mesmos ovócitos, sendo submetidos a tratamento idêntico, minimizando a variação intra-ensaio, ainda que ocorra variação entre ensaios.

Comparando-se os dois métodos de resfriamento, para PUKAZHENTHI *et al.* (1999), o resfriamento lento causa menos efeitos deletérios ao acrossoma dos espermatozóides em gatos domésticos. Em seus resultados, o resfriamento lento do sêmen mantém 75,5% das células com acrossoma intacto, mas não houve o congelamento das amostras, que é um fator fundamental que deve ser considerado para lesões estruturais, tanto em relação ao congelamento propriamente dito como em relação à adição do crioprotetor. Em estudo de criopreservação de sêmen de leopardo nebuloso e comparando os métodos de resfriamento rápido e lento, PUKHAZHENTI *et al.* (2004) observaram que o percentual de espermatozóides com acrossoma intacto pós-descongelamento foi similar ( $p < 0,05$ ) nos dois tratamentos. No presente estudo, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos para os dados de acrossoma, porém as taxas de ligação espermática diferiram. Em gato-do-mato-pequeno, o sêmen resfriado lentamente apresentou melhor taxa de ligação, enquanto para jaguatirica e gato doméstico, o sêmen resfriado rapidamente foi o que apresentou melhores resultados de ligação espermática. Para AGCA e CRITSER (2002) e HAMMERSTEDT, GRAHAM e NOLAN (1990), o contato prolongado dos espermatozóides com o glicerol, como o que ocorre durante o resfriamento lento, pode ser letalmente tóxico à célula e isto pode justificar o pior resultado deste tratamento para jaguatirica e gato doméstico. Esta sensibilidade ao glicerol varia com a espécie e pode ser atribuída pela diferente composição

lipídica (fosfolipídios, glicolipídios e esteróis) da membrana entre as espécies (AGCA e CRITSER, 2002; HAMMERSTEDT, GRAHAM e NOLAN, 1990). Os tratamentos de resfriamento rápido e lento podem, mesmo que por diferentes mecanismos, causar alterações ultraestruturais e/ou bioquímicas na membrana celular ou ainda em receptores de ligação espermática que podem comprometer a habilidade de ligação do espermatozóide à zona pelúcida (ROTH, SWANSON e WILDT, 1994).

Um índice que não foi avaliado no presente trabalho foi a longevidade dos espermatozóides submetidos aos dois tratamentos. Segundo MAZUR (1984) e WATSON (2000), o tempo de sobrevivência dos espermatozóides depende, entre outros fatores, da qualidade inicial da amostra, da velocidade de resfriamento, da composição do meio crioprotetor e da velocidade de descongelamento. Comparando a longevidade de espermatozóides de jaguatirica, gato-do-mato-pequeno e gato-maracajá, MORAIS (2001) demonstrou que o gato-do-mato-pequeno apresentou tempo de sobrevivência superior em relação às outras espécies. E da mesma forma que possui longevidade espermática diferenciada, esta característica espécie-específica pode explicar uma possível resistência à exposição ao glicerol que justifica a melhor ligação espermática para sêmen resfriado lentamente.

SONGSASEN e LEIBO (1997), HOLT (2000) e YU *et al.* (2002) relataram que características determinadas geneticamente podem ser responsáveis por variações individuais quanto à resistência dos espermatozóides à criopreservação e conseqüente manutenção da viabilidade e do potencial de fertilização. Um exemplo desta variação individual no presente estudo refere-se a um macho de jaguatirica, cujo sêmen foi testado em cinco ensaios, com ligação espermática nula ou próxima de zero, mesmo apresentando as demais características do sêmen (IME, integridade de acrossoma, morfologia e percentual de células viáveis) similares às dos demais indivíduos da mesma espécie.

Ensaio com pequeno número de espermatozóides ligados podem ser decorrentes da menor habilidade do próprio espermatozóide em interagir com a

zona pelúcida e penetrá-la. Esta incapacidade de interação pode estar relacionada com uma deficiência de proteínas da superfície do espermatozóide ou de receptores locais envolvidos na ligação à zona pelúcida. Fatores que afetam a ultraestrutura, os receptores de ligação, a motilidade e o metabolismo do espermatozóide e a capacidade de reação acrossomal também podem ser responsáveis pela menor capacidade de ligação espermática (ROTH, SWANSON e WILDT, 1994).

No presente estudo, metade dos ensaios realizados não apresentou resultados satisfatórios, quer seja pela característica do sêmen, como a anteriormente citada, ou por problemas técnicos relativos ao próprio ensaio, o que revela ser indispensável, como à todo e qualquer procedimento experimental, um controle de qualidade extremamente rígido em todas as etapas envolvidas, já que modificações mínimas no protocolo, mesmo que involuntárias, podem prejudicar o experimento e inutilizar os dados obtidos.

Como a zona pelúcida é a maior barreira seletiva para a entrada do espermatozóide no ovócito, os resultados dos ensaios de ligação espermática podem **sugerir** a capacidade fertilizante de uma amostra, ainda que parcialmente. Entretanto, diferenças entre tratamentos ou indivíduos podem ser detectadas após avaliação de um número relativamente grande de ovócitos, o que limita a utilização destes ensaios (WABERSKI *et al.*, 2005). Maneiras de minimizar as variações entre os ensaios incluem a utilização de hemi-zonas, de modo que os espermatozoides provenientes de machos ou tratamentos diferentes, tenham condições experimentais idênticas. O presente estudo é, provavelmente, o primeiro relato de um ensaio de competição, onde os espermatozoides, de maneira similar aos ensaios de hemi-zona, são testados em condições idênticas. As vantagens do método aqui utilizado incluem a manutenção da integridade da zona pelúcida e a necessidade de um menor número de ovócitos testados para se detectar diferenças estatisticamente significativas.

A falta de correlação observada entre as taxas de ligação espermática e os índices de motilidade espermática, percentual de acrossoma intacto e de células

viáveis do sêmen congelado ou com a morfologia do sêmen fresco podem ter ocorrido em virtude do pequeno número de amostras testado. Porém, também pode indicar que os métodos normalmente utilizados para avaliar o sêmen após o descongelamento não são eficazes em prever a capacidade fecundante do espermatozóide. Neste sentido, os ensaios de ligação espermática passam a ter grande importância como método de seleção prévia das amostras a serem utilizadas na aplicação de biotécnicas reprodutivas, já que poderiam aumentar as chances de sucesso em experimentos como a inseminação artificial por meio de laparoscopia, como ocorre com espécies de felinos selvagens.

Soma-se ainda o fato de que os ensaios de ligação espermática competitiva podem ser utilizados como uma ferramenta importante na compreensão de inúmeros fatores que controlam a fertilização, como por exemplo estudos sobre a fisiologia espermática, identificação de fatores de capacitação e reação acrossomal, na busca de métodos contraceptivos para felinos domésticos, como os protocolos testados por RINGLEB, ROHLER e JEWGENOW (2004), além da determinação de protocolos mais adequados para a criopreservação de sêmen de felinos.

## 8. CONCLUSÕES

Com base nas condições experimentais aqui descritas e nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

1. Os dois métodos de resfriamento pré-congelamento de sêmen, para as três espécies, reduziram significativamente o índice de motilidade e o percentual de células com acrossoma intacto em relação à amostra fresca, independente da velocidade do resfriamento;
2. As diferenças entre as espécies foram mínimas, sendo significativa apenas para o método de resfriamento lento que causou maior lesão de acrossoma em jaguatiricas;
3. A análise do sêmen por citometria de fluxo mostrou-se eficiente para detectar diferenças significativas entre as espécies e tratamentos, com uma melhor resistência celular à criopreservação em gato-do-mato-pequeno, nos dois tratamentos;
4. A taxa de maturação *in vitro* de ovócitos de gatas domésticas observada foi adequada e reflete a eficiência dos protocolos utilizados;
5. Os ovócitos desnudos não diferem daqueles maturados *in vitro* na taxa de ligação espermática, podendo ser igualmente utilizados em ensaios *in vitro*;
6. Os ensaios de ligação espermática competitiva, diferente das avaliações espermáticas de rotina, permitiram a detecção de diferenças significativas entre os dois métodos de resfriamento para todas as espécies;
7. O sêmen de jaguatirica e gato doméstico, tratado pelo método de resfriamento rápido, foi mais eficiente na ligação à zona pelúcida de ovócitos de gatas domésticas;
8. O sêmen de gato-do-mato-pequeno, tratado pelo método de resfriamento lento, foi mais eficiente na ligação à zona pelúcida de ovócitos de gatas domésticas;
9. Os protocolos de congelamento de sêmen devem ser ajustados de modo espécie-específico para se obter melhores índices pós-descongelamento.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGCA, Y.; CRITSER, J.K. Cryopreservation of spermatozoa in assisted reproduction. In: Carr, B.R.; TAN,S.L.; GOSDEN, R.S..**The Cryobiology of Assisted Reproduction: Gametes and Gonads**, Seminars in Reproductive Medicine, vol. 20, n. 1, p. 15-23, 2002.

AMANN, R.P. Cryopreservation of sperm *In*: KNOBIL, E. **The Physiology of Reproduction**, 2. Ed, New York: Raven Press, p. 773 – 83, 1999.

ANDREWS, J.C.; HOWARD, J.G.; BAVISTER, B.D.; WILDT, D.E. Sperm capacitation in the domestic cat (*Felis catus*) and leopard cat (*Felis bengalensis*) as studied with salt-stored zona pellucida penetration assay. **Molecular Reproduction and Development**, vol. 31, p. 200-201,1992.

BRINSKO, S.P.; VAN WAGNER, G. S.; GRAHAM, J. K.; SQUIRES, E.L.; Motility, morphology, and triple stain analysis of fresh, cooled and frozen-thawed stallion sperm. **7<sup>th</sup> International Symposium on Equine Reproduction**, 1998.

BYERS, A.P.; DONOGHUE, A.M.; ROTH, T.L.; WILDT, D.E. Oocyte nuclear maturation at the time of oocyte aspiration is independent of in vitro fertilization potential in the domestic cat. **The Journal of Experimental Zoology**, vol. 270, p. 399-404, 1994.

COMIZZOLI, P.; WILDT, D.E.; PUKAZHENTHI, B.S. In vitro development of domestic cat embryos following intra cytoplasmic sperm injection with testicular spermatozoa In: 5<sup>th</sup> INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CANINE AND FELINE REPRODUCTION, 2004 Embu das Artes, São Paulo. **Abstracts Book: Basic and Applied Research on Domestic, Exotic and Endangered Carnivores**. Embu das Artes, São Paulo, Brazil, p. 114-116.

COMIZZOLI, P.; WILDT, D.E.; PUKAZHENTHI, B.S. Overcoming poor in vitro nuclear maturation and developmental competence of domestic cat oocytes during the non-breeding season. **Reproduction**, vol. 126, p. 809-816, 2003.

DOMINKO, T., CHAN, A., SIMERLY, C., LUETJENS, C.M., HEWITSON, L., MARTINOVICH, C.; SCHATTEN, G. Dinamic imaging of the metaphase II spindle and maternal chromossomes in bovine oocytes: implications for enucleation efficiency verification, avoidance of parthenogenesis, and successful embryogenesis. **Biology of Reproduction**, vol. 62, p. 150 – 154, 2000.

DONOGHUE, A.M.; JOHNSTON, L.A.; SEAL, U.S.; ARMSTRONG, D.L.; TILSON, R.L.; WOLF, P.; PETRINI, K.; SIMMONS, L.G.; GROSS, T.; WILDT, D.E. In vitro

fertilization and embryo development in vitro and in vivo in the tiger (*Panthera tigris*). **Biology of Reproduction**, vol. 43, p. 733-744, 1990.

EPPIG, J.J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. **Reproduction**, vol. 122, p. 829-838, 2001.

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

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

GARNER, D. L.; JOHNSON, L. A . Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. **Biology of Reproduction**, vol 53, p. 276 – 284, 1995.

GOODROWE, K.L.; HAY, M.A .; PLATZ, C.C.; BEHERNS, S.K.; JONES, M.H.; WADDEL, W.T. Characteristics of fresh and frozen-thawed red wolf (*Canis rufus*) spermatozoa . **Animal Reproduction Science**, vol. 53, p. 299-308, 1998.

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

GOODROWE, K.L.; HAY, M.; KING, W.A .; Nuclear maturation of domestic cat ovarian oocytes in vitro. **Biology of Reproduction**, vol. 45, p. 466-470, 1991.

GRAHAM, J.K. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 239 – 247, 2001.

GRAHAM, J.K. Analysis of stallion sperm and its relation to fertility. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, vol. 12, p. 119-130, 1996.

HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K.; NOLAN, J. Cryopreservation of mammalian sperm: what do we ask them to survive. **Journal of Andrology**, vol. 11, n. 1, p. 73-87, 1990.

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

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

HOWARD, J.G. Semen collection and analysis in carnivores. In: FOWLER, M. **Zoo and Wildlife Medicine: current therapy**. 3 ed. Philadelphia: W.B. Saunders, p. 390–399, 1993.

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

HOWARD, J.G.; BROWN, J.L.; BUSH, M.; WILDT, D.E. Teratospermic and normospermic domestic cats: ejaculate traits, pituitary-gonadal hormones, and improvement of spermatozoal motility and morphology after swim-up processing. **Journal of Andrology**, vol. 11, n. 3, p. 204 – 215, 1990.

HOWARD, J.G.; WILDT, D.E. Ejaculate-hormonal traits in the leopard cat (*Felis bengalensis*) and sperm function as measured by in vitro penetration of zona-free hamster ova and zona-intact domestic cat oocytes. **Molecular Reproduction Development**. vol. 26, p. 163-174, 1990.

HOWARD, J.G.; BUSH, M.; WILDT, D.E. Semen collection, analysis and cryopreservation in nondomestic mammals. In MORROW, D. **Current Therapy in Theriogenology**. Philadelphia: W.B. Saunders, p . 1047 – 1053, 1986.

JEWGENOW, K.; STOLTE, M. Isolation of preantral follicles from nondomestic cats – viability and ultrastructural investigations. **Animal Reproduction Science**, vol. 44, p. 183-193, 1996.

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

KIRK, E. S.; Flow cytometric evaluation of stallion sperm; Curitiba, 2001, 42 f. **Dissertação de Mestrado – Physiology; Colorado State University; Colorado – USA; 2001.**

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

LOPES, M.D. **Análise histológica, ultra-estrutural e avaliação da maturação nuclear de oócitos de gatas domésticas (*Felis catus*)**. Botucatu, 2002. 137 f. Tese (Livre Docência) – UNESP - Campus de Botucatu.

LUVONI, G.C.; CHIGIONI, S. Cultural strategies for maturation of carnivores oocytes. In: 5<sup>th</sup> INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CANINE AND FELINE REPRODUCTION, 2004, Embu das Artes , São Paulo. **Abstracts Book: Basic and Applied Research on Domestic, Exotic and Endangered Carnivores**. Embu das Artes, São Paulo, Brazil, p. 30.

MAZUR, P. Fundamental aspects of the freezing of cells, with emphasis on mammalian ova and embryos. **PS – II – 1**, p. 99–114, 1984.

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

MORAES, W.; MORAIS, R.N.; MOREIRA, N.; LACERDA, O.; GOMES, M.L.F.; MUCCIOLO, R.G.; SWANSON, W.F. Successful artificial insemination after exogenous gonadotropin treatment in the ocelot (*Leopardus pardalis*) and tigrina (*Leopardus tigrinus*). In: AMERICAN ASSOCIATION OF ZOO VETERINARIANS ANNUAL MEETING, Houston, 1997. **Proceedings**. p. 334–336.

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**, vol. 57, p. 2027–2041, 2002.

MORAIS, R.N. Reproduction in small felid males. In: FOWLER, M.E.; CUBAS, Z.S. **Biology, medicine and surgery of South American wild animals**. Iowa: Iowa State University Press, p. 312 - 316, 2001.

MORAIS, R.N. **Fisiologia reprodutiva de pequenos felinos (*Leopardus pardalis* Linnaeus, 1758; *Leopardus wiedii*, Schinz, 1821; e *Leopardus tigrinus*, Schreber, 1775): Sobre a função testicular (gametogênica e esteroidogênica) de machos em cativeiro, incluindo variações sazonais**. São Paulo, 1999. 177 f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Reprodução Animal.

MORATO, R.G.; GUIMARÃES, M.A.B.V.; FERREIRA, F.; VERRESCHI, I.T.N.; BARNABE, R.C. Reproductive characteristics of captive male jaguars (*Panthera onca*). **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**, São Paulo, vol. 36, n. 5, p. 262-266, 1999.

MORATO, R.G.; BARNABE, R.C. Biotécnicas de reprodução aplicadas à preservação de felídeos selvagens. **Revista Clínica Veterinária**, São Paulo, Ano III, nº 12, janeiro/fevereiro, p. 24-26, 1998.

OTA, C.C.C. **Efeito das diferentes concentrações de glicerol sobre a qualidade espermática após criopreservação em gatos domésticos (*Felis catus*)**. Curitiba, 2001 42 f. Monografia – Curso de Especialização em Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

OTA, C.C.C.; MUCCILOLO, R.G.; GOMES, M.L.F.; LACERDA, O .; MORAIS, R.N.; Criopreservação de sêmen de pequenos felinos – impacto sobre a motilidade espermática e integridade do acrossoma. **XII Reunião da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FESBE**, resumo 11-46, p. 285, 1998.

PEÑA, A.I.; BARRIO, F.; QUINTELA, L.A.; HERRADÓN, P.G. Effect of different glycerol treatments on frozen-thawed dog sperm longevity and acrossomal integrity. **Theriogenology**, vol. 50, p. 163-174, 1998.

POPE, C.E.; GOMEZ, M.C.; DRESSER, B.L. In vitro embryo production and embryo transfer in domestic and non domestic cats. In: 5<sup>th</sup> INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CANINE AND FELINE REPRODUCTION, 2004, Embu das Artes , São Paulo. **Abstracts Book: Basic and Applied Research on Domestic, Exotic and Endangered Carnivores**. Embu das Artes, São Paulo, Brazil, p. 108-109.

POPE, C.E.; JOHNSON, C.A .; McRAE, M.A .; KELLER, G.L.; DRESSER, B.L. Development of embryos produced by intracytoplasmic sperm injection of domestic cat oocytes, (Abstract). **Theriogenology**, vol. 47, 1, p. 403, 2003.

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

POPE, C.E.; ZHANG, Y.Z.; DRESSER, B.L. A simple staining method for evaluating acrossomal status of cat spermatozoa. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, vol. 22, n. 1, p. 87 – 95, 1991.

PUKAZHENTHI, B.; LAROE, D.; CROSIER, A.; BUSH, L.M.; SPINDLER, R.; PELICAN, K.; BUSH, M.; HOWARD, J.; WILDT, D.E. Challenges in cryopreservation of clouded leopard (*Neofelis nebulosa*) spermatozoa. In: 5<sup>th</sup> INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CANINE AND FELINE REPRODUCTION, 2004, Embu das Artes , São Paulo. **Abstracts Book: Basic and Applied Research on Domestic, Exotic and Endangered Carnivores**. Embu das Artes, São Paulo, Brazil p. 134-136.

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

PUKAZHENTHI, B.; NOILES, E.; PELICAN K.; DONOGHUE,A.; WILDT, D.; HOWARD, J.G. Osmotic effects on feline spermatozoa from normospermic versus teratospermic donors. **Cryobiology**, vol. 40, p. 139-150, 2000.

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

QUEIROZ, V.S.; FRANCA, G.D.; ADANIA, C.H.; GUIMARÃES, M.A.B.V. Evidence of cold induced damage in spermatozoa of ocelots (*Leopardus pardalis*) after short term transportation. In: **Proceedings of the 1<sup>st</sup> International Symposium on Assisted Reproductive Technologies: Conservation & Genetic Management Wildlife**. Omaha, NE, p. 303-305, 2002.

RATH, D.; TÖPFER-PETERSEN, E.; MICHELMANN, HW.; SCHWARTZ, P.; EBELING, S.; Zona pellucida characteristics and sperm-binding patterns of in vivo and in vitro produced porcine oocytes inseminated with differently prepared spermatozoa. **Theriogenology**, vol. 63, p. 352–362, 2005.

RINGLEB, J.; ROHLEDER, M.; JEWGENOW, K. Impact of feline zona pellucida glycoprotein B-derived synthetic peptides on *in vitro* fertilization of cat oocytes. **Reproduction**, vol. 127, n. 2, p. 179-186, 2004.

ROTH, T.L.; SWANSON, W.F.; BLUMER, E.; WILDT, D.E. Enhancing zona penetration by spermatozoa from a teratospermic species, the cheetah (*Acinonyx jubatus*). **The Journal of Experimental Zoology**, vol. 271, p. 323-330, 1995.

ROTH, TL.; SWANSON, W.F.; WILDT, D.E. Developmental competence of domestic cat embryos fertilized in vivo versus in vitro. **Biology of Reproduction**, vol. 51, p. 441-451, 1994.

SINOWATZ, F.; WESSA, E.; NEUMÜLLER, C.; PALMA, G. On the species specificity of sperm binding and sperm penetration of the zona pellucida. **Reproduction of Domestic Animals**, vol. 38, p. 141-146, 2003.

SONGSASEN, N.; LEIBO, S.P. Cryopreservation of mouse spermatozoa II Relationship between survival after cryopreservation and osmotic tolerance of spermatozoa from three strains of mice. **Cryobiology**, vol. 35, p. 255-269, 1997

SPINDLER, R.E.; WILDT, D.E. Circannual variations in intraovarian oocyte but not epididymal sperm quality in the domestic cat. **Biology of Reproduction**, vol. 61, p. 188 -194, 1999.

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

STRÖM-HOLST, B.; LARSSON, B.; LINDE-FORSBERG, C.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Sperm binding capacity and ultrastructure of the zona pellucida of

stored canine oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**. vol. 119, p. 77-83, 2000.

SZASZ F., SIRIVAIDYAPONG S., CHENG F.P., VOORHOUT W.F., MARKS A.; COLENBRANDER B. Detection of calcium ionophore induced membrane changes in dog sperm as a simple method to predict the cryopreservability of dog semen. **Molecular Reproduction Development**, vol. 55, p. 289–298, 2000.

SWANSON, W.F.; BROWN, J.L. International training programs in reproductive sciences for conservation of Latin American felids. **Animal Reproduction Science**, vol. 82 – 83, p. 21–34, 2004.

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

SWANSON, W.F.; PAZ, R.C.R.; MORAIS, R.N.; GOMES, M.L.F.; MORAES, W.; ADANIA, C.H.; Influence of species and diet on efficiency of in vitro fertilization in two endangered Brazilian felids – the ocelot (*Leopardus pardalis*) and tigrina (*Leopardus tigrinus*), (Abstract). **Theriogenology**, vol. 57, n. 1, p. 593, 2002.

SWANSON, W.F. Reproductive biotechnology and conservation of the forgotten felids – the small cats. **Proc 1<sup>st</sup> Inter Symp Assisted Reproductive Technology for Conservation & Genetic Management of Wildlife**, p . 100–200, 2001.

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

SWANSON, W.F.; HOWARD, J.G.; ROTH, T.L.; BROWN, J.L ALVARADO, T.; BURTON, M.; STARNES, D.; WILDT, D.E. Responsiveness of ovaries to exogenous gonadotrophins and laparoscopic artificial insemination with frozen-thawed spermatozoa in ocelots (*Felis pardalis*). **Journal of Reproduction and Fertility**, vol. 106, n.1, p .87–94, 1996a.

SWANSON, W.F.; ROTH, T.L.; BLUMER, E.; CITINO, S.B.; KENNY, D.; WILDT, D.E. Comparative cryopreservation and functionality of spermatozoa from the normospermic jaguar (*Pantera onca*) and teratospermic cheetah (*Acinonyx jubatus*). **Theriogenology**, vol. 45, n. 1, p . 241, 1996b.

THURMON, J.C.; TRANQUILLI, W.J.; BENSON, G.J. Preanesthetics and Anesthetics Adjuncts. In: **Lumb & Jones Veterinary Anesthesia**. 3<sup>rd</sup>. ed., Library of Congress, USA, p. 195-197, 1996.

VANDER, A.J.; SHERMAN, J.H.; LUCIANO, D.S. The kidneys and regulation of water and inorganic ions In: **Human Physiology: The Mecanisms of Body Function**. 8<sup>th</sup> ed., McGraw-Hill Higher Education, p. 517-518, 2001.

WABERSKI, D.; MAGNUS, F.; MENDONÇA FERREIRA, F.; PETRUNKINA, A.M.; WEITZE, E.; TÖPFER-PETERSEN, E. Importance of sperm-binding assays for fertility prognosis of porcine spermatozoa. **Theriogenology**, vol. 63, p. 470–484, 2005.

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

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

WILDT, D.E., MONFORT, S.L.; DONOGHUE, A.M.; JONHSTON, L.A .; HOWARD, J.G. Embryogenesis in conservation biology – or, how to make an endangered species embryo. **Theriogenology**. vol. 37, n. 1, p. 161-184, 1992.

WOLFE, B.A .; WILDT, D.E. Development to blatocysts from in vitro maturation and fertilization of domestic cat oocytes following prolonged cold storage ex situ. **Journal of Reproduction Fertility**. vol. 106, p.135-141, 1996.

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

WOOD, T.C.; MONTALI, R.J.; WILDT, D.E. Follicle-oocyte atresia and temporal taphonomy in cold-stored domestic cat ovaries. **Molecular Reproduction Development**. vol. 46, p. 190-200, 1997.

WOOD, T.C.; BYERS, A .P.; JENNETTE, B.E.; WILDT, D.E. Influence of protein and hormone supplementation on in vitro maturation and fertilization of domestic cat eggs. **Journal of Reproduction fertility**. vol. 104, p. 315-323, 1995.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D.; GREENWALD, G.S.; MARKERT, C.; PFAFF, D.W. *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press Ltd, p. 189 – 317, 1994.

YU, I.; SONGSASEN, N.; GODKE, R.A .; LEIBO, S.P.; Diferences among dogs in response of their spermatozoa to cryopreservation using various cooling and warmig rates. **Cryobiology**. vol. 44, p. 62-78, 2002.

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