

GEDIENDSON RIBEIRO DE ARAUJO

USO DE SONDAS FLUORESCENTES E ENSAIO DE LIGAÇÃO A OVÓCITOS HETERÓLOGOS E A MEMBRANA PERIVITELÍNICA DE OVO DE GALINHA (*Gallus gallus*) PARA A AVALIAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES FRESCOS E DESCONGELADOS DE JAGUATIRICA (*Leopardus pardalis*)

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa, como  
parte das exigências do Programa de  
Pós-Graduação em Medicina  
Veterinária, para obtenção do título  
*Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2012

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

A663u  
2012

Araújo, Gediendson Ribeiro de, 1981-

Uso de sondas fluorescentes e ensaio de ligação a ovócitos heterólogos e a membrana a perivitelínica de ovo de galinha (*Gallus gallus*) para a avaliação de espermatozoides frescos e descongelados de jaguatirica (*Leopardus pardalis*) / Gediendson Ribeiro de Araújo. – Viçosa, MG, 2012.

vii, 64 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Tarcízio Antônio Rego de Paula.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. *Leopardus pardalis* – Espermatozoides – Análise. 2. Sondas de DNA. 3. Semên – Criopreservação. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 599.752

GEDIENDSON RIBEIRO DE ARAUJO

USO DE SONDAS FLUORESCENTES E ENSAIO DE LIGAÇÃO A OVÓCITOS HETERÓLOGOS E A MEMBRANA PERIVITELÍNICA DE OVO DE GALINHA (*Gallus gallus*) PARA A AVALIAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES FRESCOS E DESCONGELADOS DE JAGUATIRICA (*Leopardus pardalis*)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título *Magister Scientiae*.

APROVADA: 10 de fevereiro de 2012.

---

José Domingos Guimarães  
(Coorientador)

---

Juliano Vogas Peixoto

---

João Bosco Gonçalves de Barros

---

Tarcízio A.R. de Paula  
(Orientador)

## DEDICATÓRIA

Aos meus Pais, Gediel e Lana, por nunca terem medido esforços na realização dos meus sonhos, pelas orações e amor. Ao vovô Nozinho e vovó Geni por sempre torcerem pelas minhas escolhas. A vovó Cida (*in memorian*), seu amor pelos animais e incentivo contribuíram grandemente para a minha escolha profissional. A Thyara por todo amor e fundamental contribuição na realização desse trabalho.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pelo dom da vida, por ter me dado uma família maravilhosa, pelos livramentos que não foram poucos e pelas portas fechadas, pois creio que Ele sempre deu o melhor para mim.

Aos meus pais, Gediel Ribeiro de Araujo e Lana Cristina Ribeiro de Araujo, o que os senhores me ensinaram nem a melhor universidade pode ensinar. Obrigado por todo o sacrifício que fizeram para que eu chegasse até aqui. Mama e papa, essa vitória é fruto das suas orações. Amo vocês!!!

Aos meus queridos irmãos, Junior, Elsinho, Laninha, Gêssica, Gabriel, Gabriela, Geovana, Gean e Guilherme, que mesmo de longe torcem por cada vitória conquistada. Saudades de vocês.

A vovó Geni e o vovô Nosinho por todo carinho e exemplo de vida.

A todos os meus tios, tias, cunhada (Carlinha), cunhado (Ezequiel) primos e primas por todos os dias maravilhosos que passamos juntos e pela torcida.

Em especial a minha amada esposa, Thyara de Deco Souza e Araujo, amiga e parceira de trabalho. Agradeço por todo o carinho, incentivo, orientação, amor e muita paciência. Ao meu sogro e sogra, Márcio e Fátima, por todo o carinho e acolhida na família Deco e Souza.

A minha cunhada Thais, amiga e colega de profissão, pelas práticas veterinárias e principalmente pelas horas divertidas em Vitória.

Aos casais de amigos, Fernanda e Roni, Alixandre e Priscila, Cibeli e Fabrizio, Fabio e Graziela, pelas noites alegres e descontraídas em Vitória.

Aos meus novos avós, tios e primos (família Deco e Souza), pelo carinho e acolhida em suas vidas.

Aos amigos de Pirassununga, Binho, Gabi e Gregui, que mesmo tendo perdido o contato, os acampamentos e pescarias na adolescência foram importantes para o gosto da pesquisa à campo.

Ao meu orientador e amigo, Tarcizio A. R. de Paula, pela oportunidade de trabalhar e aprender sobre animais silvestres, por acreditar em meu trabalho e pelos ensinamentos repassados.

Aos amigos e pesquisadores do laboratório de reprodução de mamíferos domésticos e silvestres, Thyara, Antônio Carlos, Rafael, Letícia e Saulo, a participação de cada um de vocês foi fundamental para a realização desse trabalho. Muito obrigado!

Aos amigos do CETAS-UFV, Moacir, Marcos, Carlão, Marina, Natasha, Graziella, Tabela, Letícia, Leanes, Rafael (Mãozinha), Magaldi, Anderson, Alice, Filipe (Baiano), Vinícius, Fernadinha, Ayisa, Rodrigo (Gim Gim), por todos os momentos descontraídos e por se doarem ao CETAS-UFV por longos anos.

A Priscilla Sarti e Juliano Vogas Peixoto, pela amizade e principalmente pelo profissionalismo, ensinamento e dedicação aos animais silvestres.

A equipe do projeto Suçuarana, Thyara, Rafael Garay, Letícia, Leanes, Rafael Magaldi, Anderson, Fernanda e Jéssika pelo bom trabalho e pelos dias agradáveis a campo. Estamos apenas começando!!!

Ao Professor e amigo Juliano Vogas Peixoto por aceitar o convite de participar da banca e pela valiosa contribuição.

Ao também professor e amigo João Bosco Gonçalves de Barros, pela oportunidade de ter acompanhado sua pesquisa com felinos silvestres a campo, pelas conversas descontraídas e pela participação na banca do mestrado.

Ao professor José Domingues Guimarães, pela grande ajuda na análise estatística e por participar na banca do mestrado.

Ao professor Eduardo Paulino, por abrir as portas do laboratório de cultivo celular, onde foi realizado grande parte do experimento.

Aos orientados do professor Eduardo Paulino, Saneli, Vivian, Emílio, Gean e Pedro, pela valiosa colaboração durante a experimentação.

Ao Prof. Patarroyo por ter gentilmente aberto as portas do seu Lab. para o trabalho com as sondas fluorescente.

À Rose e Beth, secretárias da Pós Graduação do Departamento de Veterinária, pela torcida e principalmente por toda ajuda burocrática.

Ao CENAP/ICMBIO, na pessoa do Dr. Ronaldo Gonçalves Morato, pelo início da parceria em prol da conservação dos carnívoros silvestres e doação da estufa de CO<sub>2</sub>.

Aos animais utilizados no experimento, Mandíbula, Diego e Tripé.

À Capes pela concessão da bolsa de Mestrado.

Ao CNPq e a Fapemig pelo apoio financeiro para a realização do experimento.

## CONTEÚDO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT .....	viii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVOS .....	4
2.1. Objetivo Geral.....	4
2.2. Objetivos específicos .....	4
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
3.1. Jaguatirica ( <i>Leopardus pardalis</i> Linnaeus, 1758).....	5
3.2. Fisiologia reprodutiva de felinos.....	6
3.3. Coleta de sêmen .....	7
3.4. Criopreservação do sêmen .....	9
3.5. Avaliação espermática .....	11
3.5.1. <i>Uso de sondas fluorescentes</i> .....	13
3.5.2. <i>Ensaio de ligação de gametas</i> .....	15
3.6. Referência bibliográfica .....	17
4. ARTIGO: Uso de sondas fluorescentes e ensaio de ligação a ovócitos heterólogos e membrana perivitelínica de ovo de galinha ( <i>Gallus gallus</i> ) para a avaliação de espermatozoides frescos e descongelados de jaguatirica ( <i>Leopardus pardalis</i> ).....	36
4.1. Introdução .....	38
4.2. Material e métodos.....	39
4.2.1 <i>Animais</i> .....	39
4.2.2. <i>Coleta e processamento do sêmen</i> .....	40
4.2.3. <i>Avaliação espermática</i> .....	41
4.2.4. <i>Teste de ligação de espermatozóides a zona pelúcida de ovócito de gata doméstica</i> .....	43
4.2.5. <i>Ensaio de ligação de espermatozóides em membrana perivitelínica de ovos de galinhas</i> .....	44
4.2.6. <i>Criopreservação espermática</i> .....	45
4.2.7. <i>Análise estatística</i> .....	46
4.3. Resultados e Discussão .....	46
4.4. Conclusões .....	54
4.5. Referências bibliográficas .....	55
5. ANEXOS .....	63
5.1. Anexo I: Composição dos meios utilizados .....	63
5.2. Anexo II: Diluições dos Fluoróforos para Preparo das Soluções Estoque e de Trabalho das Sondas Fluorescentes .....	64

## RESUMO

ARAÚJO, Gediendson Ribeiro de, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2012. **Uso de sondas fluorescentes e ensaio de ligação a ovócitos heterólogos e a membrana perivitelínica de ovo de galinha (*Gallus gallus*) para a avaliação de espermatozoides frescos e descongelados de jaguatirica (*Leopardus pardalis*).** Orientador: Tarcízio Antônio Rego de Paula. Coorientador: José Domingos Guimarães.

Estratégias de conservação *ex situ* objetivam auxiliar na manutenção de populações geneticamente viáveis, por meio de estratégias de reprodução assistida e criopreservação de materiais genéticos. Objetivou-se a validação do uso de combinação de sondas fluorescentes e do teste de ligação à zona pelúcida de ovócitos heterólogos criopreservados na qualificação de sêmen fresco e descongelados de jaguatiricas. Foram usadas três jaguatiricas mantidas em cativeiro, sendo obtidos ejaculados por meio de eletroejaculação e avaliados por testes clássicos de rotina. Através destes testes (vigor e motilidade espermáticos, hiposmótico e morfologia) observou-se queda ( $p < 0,05$ ) dos padrões qualitativos do sêmen descongelado em relação ao sêmen fresco. A associação das sondas Iodeto de Propídeo, Hoechst 33342 e Pisum Sativum Agglutinin conjugada com Lectina Fluorescente (FITC-PSA), permitiu a identificação de subpopulações espermáticas de acordo com a localização específica de lesões celulares e detectou de forma mais acurada o efeito deletério da criopreservação no sêmen. O uso de ovócitos criopreservados de gatas domésticas permitiu a observação da queda da capacidade ligante ( $p < 0,05$ ) dos espermatozoides descongelados em relação aos espermatozoides a fresco de jaguatiricas, havendo ainda correlação entre o total de ligantes nas amostras de espermatozoides a fresco com padrões qualitativos no sêmen após o descongelamento. A combinação de sondas fluorescentes utilizadas e o uso de ensaio de ligação a ovócitos heterólogos criopreservados de gatas domésticas foram mais específicos e confiáveis na detecção da queda na qualidade espermática de jaguatiricas após o descongelamento. Os espermatozóides de jaguatiricas também foram capazes de se ligar à membrana perivitelínica em ambos os tratamentos. Apesar de não observada diferença na quantidade de espermatozóides ligados nos tratamentos ( $p > 0,05$ ), houve correlação positiva ( $r = 0,91$ ;  $p < 0,05$ ) entre eles. Foi observada ainda correlação negativa entre a taxa de espermatozoides ligados na membrana perivitelínica no sêmen a fresco e no descongelado com a população de espermatozóides com cauda dobrada no sêmen descongelado ( $r = -0,81$ ;  $p < 0,05$  e  $r = -0,86$ ;  $p < 0,05$ , respectivamente) e correlação negativa ( $r = -0,71$ ;  $p < 0,05$ ) entre a população de espermatozóides com cauda fortemente dobrada (defeito maior) com a quantidade de espermatozóides ligados na

membrana perivitelínica, ambos no sêmen descongelado. Apesar dos espermatozoides de jaguatirica terem se ligado de forma satisfatória à membrana perivitelínica, o reduzido número de amostras avaliadas não permitiu demonstrar correlação com a fertilidade do espermatozoide. No entanto, o mecanismo suporte desenvolvido para a membrana permitiu a manutenção do seu estiramento durante o processamento e a definição de uma área de avaliação. Sendo assim, estudos futuros, com uma maior amostragem, são necessários para a efetiva validação desta técnica.

## ABSTRACT

ARAÚJO, Gediendson Ribeiro de, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2012. **Using fluorescent probes and sperm binding to heterologous oocytes and to perivitelline membrane, using chicken (*Gallus gallus*) eggs, for evaluate fresh and frozen-thawed ocelot (*Leopardus pardalis*) sperm.** Adviser: Tarcízio Antônio Rego de Paula. Co- Advisers: José Domingos Guimarães.

Ex situ conservation strategies aim to assist in maintaining a genetically viable population through strategies of assisted reproduction and cryopreservation of genetic resources. We aimed to validate the combination of fluorescent probes and the egg-sperm binding assay using cryopreserved oocytes in the qualification of fresh and frozen-thawed ocelot semen. Were used three captive ocelots for semen collection by electroejaculation. The semen was evaluated by conventional tests routine. Through those tests (motility and sperm progressive motility, hypoosmotic swelling test and morphology) a decrease ( $p < 0.05$ ) of the quality standards of the frozen-thawed semen compared to fresh semen was observed. The combination of the probes propidium iodide, Hoechst 33342 and Pisum sativum Agglutinin lectin conjugated to fluorescent (FITC-PSA) allowed the identification of sperm subpopulations according to the specific location of cell damage and at the same time allowed a more accurate detection of the deleterious effect of semen cryopreservation in ocelots. The use of cryopreserved oocytes of domestic cats allowed the observation of a decreasing on the binding capacity ( $p < 0.05$ ) of frozen-thawed sperm compared to fresh ocelot spermatozoa, and there was a correlation between total binding in fresh semen with the quality standards in frozen-thawed semen. The combination of fluorescent probes used and the use of sperm-egg binding assay were more specific and reliable in detecting the decrease in ocelot's sperm quality after thawing. The ocelot sperm were also able to bind the perivitelline membrane, in both treatments. Although there is no difference in the amount of bound sperm in treatments ( $p > 0.05$ ), there was a positive correlation ( $r = 0.91$ ;  $p < 0.05$ ) between them. Correlation was also observed between bound sperm to perivitelline membrane, in fresh and frozen-thawed semen, and bent tail spermatozoa in frozen-thawed semen ( $r = 0.81$ ;  $p < 0.05$  and  $r = -0.86$ ;  $p < 0.05$ , respectively). There was correlation ( $r = -0.71$ ;  $p < 0.05$ ) between the proportion of tightly bent tail (major defect) and the bound sperm to perivitelline membrane, both in frozen-thawed semen. Although ocelots spermatozoa have bound satisfactorily to perivitelline membrane, the small number of sample could not demonstrate correlation with the sperm fertility. However, the device developed for the membrane allowed the upkeep of its stretch during

processing and defined an evaluation area. Thus, futures studies, with a larger sample are needed for effective validation of this technique.

## 1. INTRODUÇÃO

Por serem predadores de topo de cadeia alimentar, os felinos influenciam diretamente na ecologia da comunidade de fauna e indiretamente na comunidade de flora das áreas onde ocorrem. Dessa forma, conservando essas espécies conseqüentemente estará conservando toda a biodiversidade local. A conservação dos animais silvestres está intrinsecamente ligada à diversidade genética e quando uma população é isolada geograficamente fica sujeita à uniformidade gênica, assim vários fatores se aliam para desencadear o processo de extinção. Entre estes fatores estão a maior susceptibilidade a doenças, aumento de anormalidades espermáticas e diminuição da fertilidade, desbalanceamento endócrino de hormônios reprodutivos que prejudicam a espermatogênese e a ovulação e a morbidade e mortalidade perinatal (O'BRIEN & MCCULLOGH, 1985; WILDT et al., 1987; MUNSON et al., 1996; EIZIRIK et al., 2001).

Neste sentido estratégias de conservação *ex situ* objetivam auxiliar na manutenção de populações geneticamente viáveis, por meio de estratégias de reprodução assistida e criopreservação de materiais genéticos (ANDRABI & MAXWELL, 2007). Entre as principais estratégias de reprodução assistida, podemos citar a criopreservação de gametas, inseminação artificial, fertilização *in vitro*, transferência de embriões e desenvolvimento *in vitro* de folículos pré antrais (JEWGENOW e STOLTE, 1996; SWANSON, 1998).

A criopreservação do sêmen possibilita a translocação apenas do material genético, podendo ser usado entre populações de vida livre isoladas, entre populações de vida livre e animais em cativeiro e entre animais mantidos em instituições distintas (SWANSON, 1998). Para minimizar os efeitos estressantes da congelação, algumas substâncias crioprotetoras são adicionadas ao diluente do sêmen, promovendo alterações

das propriedades físicas da solução. A adição de surfactantes a base de SDS (dodecil sulfato de sódio) em meios utilizados na criopreservação de sêmen de diversas espécies resultaram em aumento na motilidade espermática (PURSEL et al. 1978; NIZANSKI, 2006), integridade de acrossoma (PURSEL et al. 1978; ARRIOLA & FOOTE 1987), viabilidade espermática (ROTA et al. 1997) e elevadas taxas de fertilidade *in vivo* e *in vitro* (ROTA et al. 1997, 1999; PEÑA & LINDE-FORSBERG 2000; TSUTSUI et al. 2000). Apesar dos resultados benéficos na qualidade espermática de outras espécies, relatos sobre efeito desse componente sobre a fertilidade espermática em jaguatiricas são raros na literatura.

A fertilidade dos espermatozóides pode ser estimada por meio de testes *in vivo* e *in vitro*. Testes *in vivo*, embora decisivos na determinação da fertilidade do sêmen, requerem um grande número de animais por tratamento e podem sofrer influências de vários fatores relacionados à fêmea. As análises de rotina *in vitro*, como vigor, motilidade espermática e morfologia espermática, apesar de serem utilizadas há bastante tempo, podem ser influenciadas pela natureza subjetiva do avaliador, variabilidade entre técnicos e diferenças na implementação de padrões para a avaliação (ARRUDA, 2000; VERSTEGEN et al., 2002; CELEGHINI, 2005).

Nos últimos anos novas técnicas de avaliação *in vitro* do sêmen têm sido desenvolvidas, permitindo o conhecimento mais detalhado na avaliação da morfologia e função espermática. O uso de sondas fluorescentes ou fluorocromos isoladas ou em combinações possibilita uma análise mais criteriosa da integridade estrutural dos componentes dos espermatozóides, devido a sua característica de marcação estruturas específicas das células e detectar a integridade estrutural e funcional de forma clara (PETERSON *et al.*, 1974; ARRUDA, 2000; SILVA & GADELLA, 2006). Devido a isso, muitas sondas fluorescentes vêm sendo utilizadas para examinar a integridade e a

viabilidade espermática com o auxílio da microscopia fluorescente ou citometria de fluxo.

A capacidade do espermatozóide de se ligar à zona pelúcida é um evento crítico que culmina na fertilização (MAYENCO-AGUIRRE & PÉREZ-CORTES, 1998). Deste modo, testes de interação entre gametas, homólogos e heterólogos, são de grande importância na avaliação de técnicas de criopreservação de sêmen (CARDOSO et al., 2005). Estes testes possuem como vantagem, em relação à fertilização *in vitro*, a menor demanda de tempo, uma vez que não requer a maturação ovocitária (HEWITT & ENGLAND, 1997). No entanto, a obtenção de uma quantidade satisfatória de ovócitos de mamíferos domésticos e silvestres requer o uso de muitas fêmeas e a avaliação espermática fica sob influência da qualidade ovocitária, imprimindo um elevado “efeito fêmea” sobre o resultado (SANTOS, 2010). Diante disso, o uso de membrana perivitelínica de ovo de galinha é um promissor método de interação de gametas. Este método permite o teste de diferentes amostras de sêmen sobre a mesma superfície ligante, ou seja, diferentes fragmentos de uma mesma membrana, minimizando a variação causada pelo “efeito fêmea”. Além disso, a membrana perivitelínica é de fácil obtenção e manipulação. No entanto, apesar dos resultados satisfatórios com mamíferos domésticos (SANTOS, 2010; AMORIM, 2008), esta técnica ainda não foi testada em felinos silvestres, como a jaguatirica.

## **2. OBJETIVOS**

### *2.1. Objetivo Geral*

Avaliar a qualidade dos espermatozoides, a fresco e descongelado, de jaguatiricas usando combinação de sondas fluorescentes e testes de ligação do espermatozoide a ovócitos de gata doméstica e a membrana perivitelina do ovo de galinha.

### *2.2. Objetivos específicos*

- Realizar avaliação andrológica de três jaguatiricas mantidas em cativeiro;
- Avaliar a integridade das membranas plasmática e acrossomal usando sondas fluorescentes no sêmen a fresco e descongelado;
- Criopreservar sêmen de jaguatirica mantidos em cativeiro com meio a base de TRIS-citrato e 20% de gema de ovo, com glicerol e Equex STM Paste®;
- Avaliar a capacidade de ligação do sêmen, a fresco e descongelado, usando os testes de ligação a zona pelúcida de ovócitos de gata doméstica e membrana perivitelínica de galinha.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. Jaguaririca (*Leopardus pardalis* Linnaeus, 1758)

A jaguaririca (Figura 1) é a única espécie de felino neotropical pertencente à categoria médio porte, que engloba espécies com o peso do animal adulto variando entre 7 e 20kg (IUCN, 2011). Possui 50 cm a 1 m de comprimento, além da cauda que pode medir até 45 cm. Apresenta pelagem curta marcada por rosetas que tendem a se unir na lateral do corpo do animal formando listras correndo em cadeias paralelas, sendo possível a individualização de cada animal pela conformação das manchas em cada indivíduo, funcionando como uma impressão digital (JACOB, 2002).



Figura 1: Jaguaririca (*Leopardus pardalis*) (Fonte: João Bosco G. de Barros)

A área de ocorrência da jaguaririca abrange desde o sudoeste do Texas, nos Estados Unidos, e oeste do México até o norte da Argentina (MURRAY & GARDNER, 1997). No Brasil, ocorre em todas as regiões, com exceção do sul do Rio Grande do Sul (OLIVEIRA & CASSARO, 2005) (Figura 2).



Figura 2: Área de distribuição da Jaguaririca (IUCN, 1996)

A dieta é bastante abrangente, incluindo aves, répteis, pequenos e grandes mamíferos como veados e porcos do mato, entretanto, apresenta predominância sobre pequenos mamíferos, principalmente roedores com menos de 1 kg (EMMONS, 1988; CUBAS et al., 2006).

Em cativeiro esses animais podem viver até os 20 anos, mas dificilmente ultrapassam os 10 anos em vida livre (MURRAY & GARDNER, 1997). A média de nascimento é de 2 a 4 filhotes, que abrem os olhos após 15 a 18 dias de idade, e começam a comer dieta sólida a partir de 42 dias (FAGEN & WILEY, 1978). O período de gestação varia entre 70 e 85 dias (MELLEN, 1990; GREEN, 1991; CUBAS et al., 2006) e aparentemente os machos não contribuem com o cuidado dos filhotes.

Esses felinos apresentam hábitos diurnos e noturnos e são solitários. O macho ocupa uma área de aproximadamente 10 a 40 km<sup>2</sup>, enquanto que a fêmea ocupa uma área de 0,76 a 1,3 km<sup>2</sup> (CRAWSHAW, 1995), sendo que um macho pode sobrepor o território de até três fêmeas, e uma fêmea raramente sobrepõe o território da outra (MANTOVANI, 2001). Indivíduos subadultos podem ser tolerados nos territórios de ambos os sexos, mas atingindo a fase adulta tendem a dispersar para novas áreas, enquanto que as fêmeas geralmente se estabelecem em territórios adjacentes ao seu território natal os machos tentem a migrar para áreas mais afastadas (EMMONS, 1998; CRAWSHAW, 1995).

### 3.2. Fisiologia reprodutiva de felinos

O órgão copulatório de felinos do gênero *Leopardus*, exceto o gato maracajá (*Leopardus wiedii*) que não apresenta espículas penianas, assemelha-se ao do gato doméstico, (SWANSON *et al.*, 1995, MORAIS, 1999). Espículas penianas são estruturas córneas que começam a se desenvolver com aproximadamente 12 semanas de idade (LOPES, 2002). São responsáveis pelo estímulo neuro endócrino necessário para

o desencadeamento da ovulação durante a cópula (JOHNSTON *et al.*, 2001) e são características sexuais secundárias cujo crescimento é andrógeno dependente, podendo ser usadas como preditor da capacidade androgênica individual (ARONSON & COOPER, 1967).

A puberdade dos felinos está correlacionada com o peso corporal adulto ocorrendo mais cedo nas fêmeas (GRUFFYDD-JONES, 1993). A maturidade sexual nas fêmeas ocorre dos 18 aos 22 meses de idade e nos machos aos 30 meses (BRAZILIAN OCELOT, 2006). As fêmeas de pequenos felinos neotropicais são poliestrais de ovulação induzida, com a ovulação ocorrendo somente após o estímulo copulatório (MOREIRA *et al.*, 1994). De acordo com Eaton (1984), essas espécies não apresentavam padrão característico de sazonalidade reprodutiva, portanto, experimentações reprodutivas podem ser conduzidas durante o ano todo.

A cópula ocorre de cinco a 10 vezes por dia com montas de aproximadamente um minuto e meio e a probabilidade de concepção é de 60% (EATON, 1984; MELLEEN, 1990). O ciclo estral é de aproximadamente 25 dias e o estro dura 4,6 dias (MELLEEN, 1990). Entretanto Eaton (1977) descreve um período de sete a dez dias para o estro e um período de interestro de seis semanas.

### 3.3. Coleta de sêmen

Amostras de sêmen a serem utilizadas em programas de reprodução assistida em carnívoros podem ser obtidas por meio de vagina artificial (SOJKA & JENNINGS, 1970; ZAMBELLI & BELLUZZI, 1998), coleta diretamente do epidídimo ou ductos deferentes (HOWARD *et al.*, 1986; AXNÉR, 1998), massagem retal, coleta pós coito, manipulação digital e eletroejaculação (PLATZ *et al.*, 1978; JOHNSTONE, 1984; HOWARD *et al.*, 1986).

A manipulação digital ou o uso de vagina artificial é um excelente método, pois o ejaculado é obtido da forma mais natural possível (WILDT, 1989), o sêmen coletado por estes métodos apresentam concentração bem superior ao obtido pela eletroejaculação (SEAGER & PLATZ, 1976; DOOLEY & PINEDA, 1986; DOOLEY *et al*, 1991; HOWARD, 1993 ; SETCHEL *et al.*, 1994;). A manipulação digital tem sido rotineiramente utilizada em canídeos domésticos e selvagens como o lobo-guará e raposas, e com resultados de gestação após inseminação (HOWARD, 1993).

No caso dos animais selvagens, especialmente felinos, em que geralmente não é possível a utilização das metodologias citadas acima, a eletroejaculação é o método de escolha. Os primeiros estudos usando essa metodologia para obtenção de sêmen de felinos selvagens foram realizados por Carvalho (1968). Atualmente essa é a metodologia mais usada para coleta de sêmen em felinos (PLATZ *et al*, 1978), incluindo a jaguatirica (PLATZ & SEAGER 1978; WILDT, 1989; QUEIROZ, 2003; TEBET, 2004; ÁVILA,2009).

Amostras de sêmen obtidas pós eletroejaculação tendem a ser mais volumosas, ácidas, com menor concentração espermática e eventualmente contaminadas com urina, uma vez que a estimulação simpática por este método é maior (SEAGER & PLATZ, 1976; DOOLEY & PINEDA, 1986; DOOLEY *et al*, 1991; HOWARD, 1993 ; SETCHEL *ET AL.*, 1994). A contaminação do sêmen por urina pode ocorrer devido à voltagem utilizada, quando essa excede o máximo necessário à ejaculação, ou devido ao posicionamento muito cranial da probe retal (HOWARD, 1993). Uma forma de evitar a contaminação do sêmen é lavar a bexiga com soro fisiológico estéril antes da realização das coletas (ÁVILA, 2009).

Vários protocolos anestésicos foram usados para a eletroejaculação em felinos, sendo atualmente os mais usados a associação de cloridratos de quetamina (10 mg/Kg) e

xilazina (2 mg/Kg) pela via intramuscular (ÁVILA, 2009) e tiletamina/zolazepam (5-10 mg/kg; Zoletil 50, Virbac) com manutenção anestésica com isoflurano inalatório (QUEIROZ, 2003).

#### 3.4. Criopreservação do sêmen

O processo de criopreservação inclui várias etapas, desde a coleta, envasamento e diluição da amostra para o congelamento até o descongelamento e inseminação, cada uma delas pode provocar danos aos espermatozóides e conseqüentemente reduzir por volta de 50% o percentual de espermatozóides capazes de fertilizar um ovócito (HOWARD et al., 1991a; JOHNSTON et al., 1991a; JANUSKAUSKAS et al., 1996; WATSON, 2000; LUVONI et al., 2003; HALLAP et al., 2006).

Para minimizar os danos causados na qualidade do sêmen pela criopreservação são adicionadas substâncias crioprotetoras que atuam dentro ou fora da membrana plasmática, promovendo alterações nas propriedades físicas da solução (AMANN & PICKETT, 1987; TEBET, 2004).

Um diluente ideal para o congelamento de sêmen felino ainda não foi definido, visto que o movimento progressivo e a morfologia acrossomal são altamente afetados nos procedimentos de criopreservação com os diluentes conhecidos. A gema de ovo no meio diluidor é amplamente utilizada como agente estabilizador da membrana plasmática, protegendo-a contra o choque térmico (WATSON, 1979; HOLT, 2000a; LUVONI et al., 2003). Acredita-se que esta ação protetora seja fornecida pela sua ação coloidal no meio e pela presença da fosfatidilcolina, uma lipoproteína que interagem com a estrutura lipídica da membrana plasmática das células espermáticas, protegendo-a contra o choque térmico (WATSON, 1979, BOUCHARD *et al.*, 1990). Além disso, a gema de ovo previne a liberação da enzima hialuronidase pelo espermatozóide. (FOULKES, 1977). Alguns estudos também demonstraram que a adição de detergentes

a base de SDS (dodecil sulfato de sódio) – Equex STM Paste® e Orvus ES Paste® - aumentam o potencial de penetração das lipoproteínas da gema de ovo na membrana plasmática do espermatozoide (HOLT, 2000b; PEÑA et al., 2003).

O principal crioprotetor usado no congelamento de espermatozoides é o glicerol, que, devido ao seu baixo peso molecular, atua no interior da célula ligando-se com as moléculas de água, reduzindo a formação de cristais de gelo durante a congelação (WATSON, 1990). No entanto, altas porcentagens de glicerol no meio diluente levam a uma toxicidade que afeta a viabilidade espermática (HAMMERSTEDT *et al*, 1990; GAO et al., 1995; KATKOV et al., 1998). Em estudo com felinos, Nelson et al (1999) verificaram que espermatozoides congelados em meios diluidores acrescidos com 8% de glicerol obtiveram índice espermático (avaliação média entre vigor e motilidade do sêmen) menor em relação àqueles acrescidos de apenas 4% (43% e 67,8%, respectivamente). Já, Ávila (2009) avaliando as características seminais e de congelabilidade de sêmen de jaguatirica, usando meio diluidor acrescido em 6% de glicerol, obteve índice espermático de 50 a 60% no sêmen descongelado.

Além dos crioprotetores mencionados acima, há substâncias que devem ser incorporadas ao meio diluente, como antibióticos, tampões, estimulantes e antioxidantes. Os tampões possuem a finalidade de neutralizar o pH do meio diluente e os mais utilizados são o citrato de sódio, o tris-hidroximetilaminometano (TRIS) e o ácido N-trishidroximetil metil-2-aminometano-sulfônico (TES) (HOLT,2000a).

Em jaguatirica, alguns protocolos para criopreservação de sêmen foram testados (SWANSON et al., 1996; MORAIS, 2001; SWANSON et al., 2003; TEBET, 2004; BAUDI, 2005; ÁVILA, 2009). Tebet (2004) testou dois protocolos de criopreservação de sêmen em *Leopardus tigrinus* e *Leopardus pardalis*, um a base de Tris, Equex, glicose, gema de ovo, sulfato de amicacina, glicerol 7% e outro denominado MP-50 com açúcares, citrato de sódio, citrato de potássio, EDTA, gema de ovo, leite em pó

desnatado, Hepes, Dubelcco's Modifield Eagle's, sulfato de amicacina, glicerol 3% e dimetil formamida 2%, encontrando resultados similares entre os dois criodiluentes.

### 3.5. Avaliação espermática

O processo de criopreservação pode provocar danos aos espermatozóides e conseqüentemente reduzir a capacidade fertilizante dos espermatozoides (HOWARD et al., 1991a; JOHNSTON et al., 1991a; JANUSKAUSKAS et al., 1996; WATSON, 2000; HALLAP et al., 2006). A avaliação da qualidade espermática, portanto, é um passo necessário para se predizer a capacidade dos espermatozóides de fecundar um ovócito (PEÑA-MARTÍNEZ, 2004). A combinação de critérios mais amplamente usada para avaliar o sêmen inclui: aspecto, volume, pH, motilidade, vigor, concentração e morfologia espermática. (PLATZ et al., 1976; HOWARD, 1993; SWANSON & BROWN, 2004).

A quantificação de espermatozoides é determinada a partir da aferição do volume e da concentração do ejaculado, informações extremamente úteis para a determinação das diluições a serem realizadas. Vários fatores podem influenciar o volume e a concentração do ejaculado, incluindo o grau de estimulação sexual, o número de ejaculações sucessivas de um mesmo animal, e o método usado para coleta do sêmen (WILDT, 1989).

A motilidade espermática é necessária para a colonização do tuba uterina e para uma fertilização normal (YANAGIMACHI, 1994; SCOTT, 2000). Este parâmetro é expresso em porcentagem de movimento progressivo numa escala de 0% a 100% sendo 0 % para todos os espermatozóides imóveis e 100% para desempenho máximo dos espermatozóides, com movimentos progressivos. A qualidade do movimento executada pelos espermatozóides é avaliada pelo Vigor dentro de uma escala de 0 a 5, sendo: 0 –

Sem movimento; 1 – Fraco movimento lateral com alguma progressão; 2 – Moderado movimento lateral com ocasional progressão; 3 – Progressão lenta; 4 – Progressão regular; 5 – Progressão rápida. Para determinar um índice de motilidade espermática com ênfase na percentagem de motilidade e vigor, foi criado o Índice de Motilidade Espermática (IME), que é calculado por:  $IME = \text{Motilidade espermática (\%)} + (\text{Vigor} \times 20) / 2$  (HOWARD, 1993).

A morfologia espermática pode ser avaliada fixando-se uma alíquota de sêmen em solução de glutaraldeído a 1% ou em solução de formol salino tamponado e observando-se as células em microscópio de contraste de fase, ou utilizando corantes, como eosina-negrosina (CBRA, 1998). As patologias morfológicas espermáticas podem ser classificadas de acordo com a região de origem como: defeitos primários, aqueles que ocorrem durante o processo de espermatogênese e defeitos secundários, que são consequência do processo de maturação e transporte no epidídimo, ou de acordo com a correlação com a fertilidade como defeitos maiores (correlacionados com infertilidade) e defeitos menores (não correlacionados com infertilidade) (BLOM, 1973; WILDT et al., 1983; HOWARD et al., 1986).

Embora ejaculados com alta proporção de espermatozóides anormais possam apresentar boa fertilidade *in vivo*, estudos *in vitro* mostraram correlações negativas entre a proporção de defeitos e a habilidade de penetração em ovócitos (AXNÉR & LINDEFORBERG, 2002). São poucos os estudos que correlacionam morfologia espermática com fertilidade em felinos (DONOGHUE et al. 1992a; WILDT et al. 1993; AXNÉR et al., 1996, 1997, 1998). Em um estudo com gatos domésticos Axnér & Linde-Forsberg (2007) correlacionaram diferentes patologias com a fertilidade *in vivo* e somente as patologias de cabeça foram relacionadas com baixa fertilidade, e em contraste com os resultados em bovinos (BARTH & OKO, 1989).

A integridade e viabilidade da membrana espermática podem ser avaliadas por meio do teste hiposmótico (CLARKE & JOHNSON, 1987; ZAVOS, 1990). Quando expostos a um meio hiposmótico, espermatozóides funcionais se tornam inturgescido para estabelecer o equilíbrio osmótico, produzindo um dobramento da cauda (ZAVOS, 1990). Neild et al. (2000) na avaliação do sêmen fresco de garanhões observaram correlação do resultado obtido no teste com a taxa de prenhes, a porcentagem de espermatozóides móveis e morfologicamente normais no ejaculado. No entanto, amostras com valores baixos para o teste hiposmótico fertilizam ovócitos *in vivo* a uma taxa normal (BARRAT et al., 1989; SJOBLOM & COCCIA, 1989), porém os embriões formados apresentaram baixa capacidade de implantação (CHECK et al., 1995; KATSOFF et al., 2000). Uma hipótese é que a alteração na membrana demonstrada pelo baixo valor no teste hiposmótico está relacionada com um fator tóxico (possivelmente uma proteína) presente na membrana plasmática do espermatozóide que pode ser transferido à membrana do embrião e impedir que este se implante no útero (CHECK et al., 2001).

### 3.5.1. *Uso de sondas fluorescentes*

O uso de sondas fluorescentes ou fluorocromos isoladas ou em combinações possibilita uma análise mais criteriosa da integridade estrutural dos componentes dos espermatozoides, devido a sua característica de marcar estruturas específicas das células e detectar a integridade estrutural e funcional de forma clara (PETERSON *et al.*, 1974; ARRUDA, 2000). No entanto, a associação das sondas com o intuito de avaliação simultânea das membranas plasmáticas, acrossomal e da função mitocondrial, vem sendo realizada por protocolos laboriosos e demorados, tornando difícil sua aplicação na rotina da avaliação seminal (CELEGHINI, 2005).

As sondas fluorescentes podem ser usadas para avaliar a integridade da membrana plasmática (AMANN & PICKETT, 1987). O primeiro relato do uso de sondas fluorescentes com esta finalidade foi com sêmen humano utilizando brometo de etídio (PETERSON *et al.*, 1974), no entanto, devido a sua alta toxicidade sua aplicação tem sido restringida, impulsionando a pesquisa de novas sondas (CELEGHINI, 2005).

Pesquisas de integridade da membrana plasmática de felinos domésticos e silvestres têm sido realizadas utilizando diferentes associações de sondas fluorescentes. Tebet (2004) utilizou Iodeto de Propídeo e Diacetato de carboxifluoresceína para verificar a integridade da membrana plasmática de espermatozóides criopreservados de gato doméstico (*Felis catus*), Jaguaririca (*Leopardus pardalis*) e Gato do mato pequeno (*Leopardus tigrinus*). O Iodeto de Propídeo (IP) possui afinidade ao DNA e cora em vermelho o núcleo da célula com membrana plasmática lesionada. O diacetato de carboxifluoresceína (CFDA), por sua vez é hidrolisado por esterases transformando-se em diacetato de carboxifluoresceína na forma livre, sendo retida apenas dentro da célula com membrana intacta, emitindo assim uma fluorescência de coloração verde amarelada (HARRISON & VICKERS, 1990; SOUZA, 2001).

Baudi (2005) em seu estudo do efeito do resfriamento sobre a função espermática de sêmen criopreservado de felinos (*Leopardus tigrinus*, *Leopardus pardalis* e *Felis catus*) avaliado pelo ensaio competitivo de ligação em ovócito de gata doméstica (*Felis catus*), usou o Iodeto de propídeo e como contra corante o corante supravital Hoechst. Esse corante é comercializado na forma do Hoechst 33258 (H258) ou do Hoechst 33342 (H342), sendo ambos utilizados para verificar a integridade de membrana plasmática, ligando-se especificamente ao DNA e marcando o núcleo da célula em azul (CASEY *et al.*, 1993; MAXWELL *et al.*, 1997). A diferença entre esses corantes está na permeabilidade da membrana, uma vez que o H258 marca células com

membrana lesada e o H342 marca células com membrana íntegra (DE LEEUW *et al.*, 1991; CASEY *et al.*, 1993; MAXWELL *et al.*, 1997).

Já Queiroz (2003), em seu estudo do efeito das condições de manipulação do sêmen de jaguatiricas sobre a capacitação e a integridade morfológica e funcional dos espermatozóides, usou o Iodeto de propídeo associado ao FITC-PNA. Este é uma associação de aglutininas de vegetais, nesse caso o amendoim (*Arachys hypogaea*), que possuem afinidade por glicoproteínas encontradas nas membranas acrossomais dos espermatozóides (YANAGIMACHI, 1994). Essa aglutinina associada como o isotiocianato de fluoresceína (FITC), um marcador fluorescente, emite coloração esverdeada no acrossoma lesado. A utilização do FITC-PNA já foi validada por Long *et al.* (1996) que através da microscopia eletrônica de transmissão verificou que o corante apresentava uma ligação bastante específica na membrana externa do acrossomo de espermatozóides de gato doméstico. Outra aglutinina bastante associada ao FITC é a aglutinina da ervilha (*Pisum sativum* – PSA), que se liga aos glicoconjugados da matriz acrossomal e também emitem coloração esverdeada no acrossoma lesado (Cross & Meizel, 1989).

### 3.5.2. *Ensaio de ligação de gametas*

A ligação do espermatozoide ao ovócito envolve o reconhecimento de receptores presentes na zona pelúcida do ovócito pelas proteínas de ligação correspondentes na superfície do espermatozoide (SINOWATZ *et al.*, 2003; RATH *et al.*, 2005). O contato inicial entre o espermatozóide e a zona pelúcida dos ovócitos induz a reação acrossomal permitindo a exposição dos receptores secundários presentes na membrana do espermatozóide (RATH *et al.*, 2005).

Visto que a capacidade do espermatozóide de se ligar à zona pelúcida é um evento crítico que culmina na fertilização (MAYENCO-AGUIRRE & PÉREZ-CORTES, 1998) os testes de interação entre gametas são uma opção para avaliar a

qualidade espermática. Neste tipo de ensaio, podem ser utilizados ovócitos homólogos (da mesma espécie doadora do sêmen) ou heterólogos (espécies distintas). Holst et al (2000) compararam ensaios de ligação espermática em cães entre ovócitos frescos e descongelados, armazenados em solução salina. Apesar de encontrarem diferença de ligação espermática em ovócitos frescos os resultados indicaram que os gametas descongelados podem ser usados em ensaios para avaliação espermática.

A partir de ensaios realizados com humanos desde os anos 80, o teste de ligação entre gametas homólogos mostrou-se eficaz para distinguir indivíduos pertencentes a grupos, férteis, inférteis e sub-férteis (LIU & BAKER, 1993; OEHNINGER, et al., 1997; BASTIAAN et al., 2002). Atualmente este teste já foi usado para felinos, inclusive a jaguatirica, (HOWARD et al., 1990; ANDREWS et al., 1992; GOODROWE, 1992; BAUDI, 2005).

Apesar da maior confiabilidade depositada no teste de ligação, a obtenção dos ovócitos, ou do número adequado de animais, bem como seu custo mais elevado, pode ser um fator limitante, (ROTA et al., 1999; TARDIF et al., 1999) e a variação individual de qualidade entre as células e suas doadoras, pode gerar viés na interpretação dos resultados (EILTS, 2005; SANTOS, 2009).

Em observações realizadas por Wishart et al. (1997) em ovos de galinhas, descobriu-se que muitos espermatozóides que não haviam fecundado o ovócito, continuavam presos à membrana perivitelina após a passagem do ovo pelo oviduto. A partir de então testou-se os ejaculados de galos de fertilidades conhecidas, porém diferentes, sobre a membrana, obtendo-se correlações significativas (BARBATO et al., 1998). Outros pesquisadores utilizaram a técnica em mamíferos, obtendo também resultados promissores (AMORIM, 2008; SANTOS, 2009; CSERMAK Jr, 2011).

O uso da membrana perivitelina tem algumas vantagens em relação aos ovócitos, uma vez que permite o teste de diferentes tratamentos sobre a mesma

superfície de ligação (fragmentos de uma mesma membrana), reduzindo o efeito fêmea sobre os resultados. Além disso, a membrana é de obtenção mais fácil e menos dispendiosa, principalmente em relação aos ovócitos de mamíferos silvestres. No mercado, já pode ser encontrado substrato sintético feito a partir da membrana. Tais apresentações foram usadas em suínos e se mostraram capazes de responder diferentemente frente a ejaculados de diferentes capacidades fertilizantes (REIS et al., 2003). Neste sentido, o teste de ligação usando membrana perivitelina de galinhas aparece como uma ferramenta promissora na avaliação espermática de mamíferos domésticos e silvestres.

### 3.6. Referência bibliográfica

AMANN, R.P., PICKETT, B.W. (1987). Principles of Cryopreservation and Review of Cryopreservation of Stallion Spermatozoa. *Equine Vet. Sci.*, v.7, n.3, p.145-173.

AMORIM, E.A.M. (2008). *Alteração da membrana espermática de suínos, bovinos e eqüinos na qualidade do sêmen*. Tese (Doutorado em Zootecnia), Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG. 174p.

ANDRABI, S.M.H., MAXWELL, W.M.C. (2007). A Review of Reproductive Biotechnologies for Conservation of Endangered Species. *Anim. Reprod. Sci.*, v.99, n.3-4, p.223- 243.

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

ARONSON, L.R. & COOPER, M.L. (1967). Penile spines of the cat: their endocrine-behaviour relations. *Anat. Rec.*, v.157, p.71-78.

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

ARRUDA, R.P. (2000). *Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)*. Tese de Livre Docência, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo. 121p.

ÁVILA, E. C. (2009). Avaliação andrológica e criopreservação do sêmen de jaguatirica (*Leopardus pardalis*, LINNAEUS, 1758). Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. 65p.

AXNÉR, E., LINDE-FORSBERG, C. (2002). Semen Collection and Assessment, and Artificial Insemination in the Cat. In: Concannon, P.W., England, G., Verstegen, J., Linde-Fosber, C. (Eds.), *Recent Advances in Small Animal Reproduction*. Ithaca: International Veterinary Information Service, Document No. A1228,0702. Disponível em: <[http://www.ivis.org/advances/Concannon/axner/chapter\\_frm.asp?LA=1](http://www.ivis.org/advances/Concannon/axner/chapter_frm.asp?LA=1)>. Acessado em 11 jan. 2012.

AXNÉR, E., LINDE-FORSBERG, C. (2007). Sperm morphology in the domestic cat, and its relation with fertility: a retrospective study. *Reprod. Dom. Anim.*, v.42, n.3, p.282-291.

AXNÉR, E., STRÖM, B., LINDE-FORSBERG, C. (1997). Sperm morphology is better in the second ejaculate than in the first in domestic cats electroejaculated twice during the same period of anesthesia. *Theriogenology*, v.47, n.4, p.929-934.

AXNÉR, E., STRÖM, B., LINDE-FORSBERG, C., GUSTAVSSON, I., LINDBLAD, K., WALLGREN, M. (1996). Reproductive disorders in 10 domestic male cats. *J. small anim*, v.37, n.8, p.394-401.

AXNÉR, E., STRÖM-HOLST, B., LINDE-FORSBERG, C. (1998). Morphology of spermatozoa in the cauda epididymidis before and after electroejaculation and a comparison with ejaculated spermatozoa in the domestic cat. *Theriogenology*, v.50, n.6, p.973-979.

BARBATO, G.F.; CRAMER, P.G.; HAMMERSTEDT, R.H. (1998). A Practical In Vitro Sperm-Egg binding assay that detects subfertile males. *Biol. Reprod.*, v.58, p.686-699.

BARRATT, C.L.R., OSBORN, J., HARRISON, P.E., MONKS, N., DUNPHY, B.C., LENTON, E. A., et al. (1989). The hypo-osmotic swelling test and the sperm mucus penetration test in determining fertilization of the human oocyte. *Hum. reprod.*, v.4, n.4, p.430-434.

BARTH, A.D., OKO, R.J. (1989). *Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa*. Iowa State University Press Inc., Ames. 285p.

BASTIAAN, H. S.; MENKVELD, R.; OEHNINGER, S.; FRANKEN D. R. (2002). Zona pellucida induced acrosome reaction, sperm morphology, and sperm-zona pellucida binding assessments among subfertile men. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 19, 329-334.

BAUDI, D.L.K. (2005). *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 (Mestrado em Ciências Veterinárias)- Setor de Ciências agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 76f.

BLOM, E. (1973). The ultrastructure of some characteristic sperm defects and proposal for a new classification of the bull spermogram. *Nord. Veterinaermed.*, v.25, p.383 – 391.

BOUCHARD, G.F., MORRIS, J.K., SIKES, J.D., YOUNGQUIST, R. S. (1990). Effect of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoal motility. *Theriogenology*, v. 34, n. 1, p. 147-157.

*Brazilian Ocelot*. (2008). Recuperado em 10 de dezembro, 2011 de <http://www.senecaparkzoo.org/resources/pdf/ocelot.pdf>.

CARDOSO, R. C. S., SILVA, A. R., SILVA, L.D.M. da. (2005). Métodos de avaliação do sêmen canino congelado. *Rev. bras. reprod. anim.*, v.29, n.3/4, p.179-187.

CARVALHO, C.T. (1968). Sêmen de grandes felinos. *Rev. bras. med. vet.*, v.2, n.4, p. 195-201.

CASEY, P.J., HILLMAN, R.B., ROBERTSON, K.R., YUDIN, A.I., LIU, I.K.M., DROBINS, E.Z. (1993). Validation of an acrosomal stain for equine sperm that differentiates between living and dead sperm. *J. androl.*, v.14, n.4, p. 289-297.

CELEGHINI E.C.C. (2005). Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes. Tese (Doutorado em Medicina

Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. 186f.

CHECK, J.H., KATSOFF, D., CHECK, M.L. (2001). Some semen abnormalities may cause infertility by impairing implantation rather than fertilization. *Med. hypotheses.*, v.56, n.5, p.653-657.

CHECK, J.H., STUMPO, L., LURIE, D., BENFER, K., CALLAN, C.A. (1995). Comparative prospective study using matched samples to determine the influence of subnormal hypoosmotic test cores of spermatozoa on subsequent fertilization and pregnancy rates following in vitro fertilization. *Hum. reprod.*, v.10, p.1197-1200.

CLARKE, R.N., JOHNSON, L. A. (1987). Effect of Liquid storage and cryopreservation of boar spermatozoa on acrossomal integrity and the penetration of zona-free hamster ova in vitro. *Gamete res.*, v.16, p.193-204.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL - CBRA. (1998). *Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal* (2nd Ed.), Belo Horizonte, Brasil: Author. 49p.

CRAWSHAW JR., P.G. (1995). *Comparative ecology of ocelot (Felis pardalis) and jaguar (Panthera onca) in a protected subtropical forest in Brazil and Argentina*. Ph. D. dissertation, University of Florida, Gainesville, FL. 195pp.

CROSS, N.L., MEIZEL, S. (1989). Methods for evaluating the acrossomal status of mammalian sperm. *Biol. reprod.*, v.41, p.635-641.

CSERMAK Jr., A.C. (2011). *Uso de sondas fluorescentes e do ensaio de ligação do espermatozóide do cão Canis (lupus familiaris) à membrana perivitelina do ovo de galinha (Gallus gallus) como método para predição da capacidade fertilizante do*

sêmen. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária)- Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 72f.

CUBAS, Z. S., SILVA, J. C. R., CATÃO-DIAS, J.L. (2006). *Tratado de animais selvagens*. São Paulo: Roca. 1376 p.

DE LEEUW, A.M., DEN DAAS, J.H., WOELDERS, H. (1991). The fix vital stain method: Simultaneous determination of viability and acrosomal status of bovine spermatozoa. *J. androl.*, v.12, p.112-118.

DONOGHUE, A. M., HOWARD, J. G., BYERS, A. P., GOODROWE, K. L., BUSH, M., BLUMER, E., et al. (1992a). Correlation of Sperm Viability with Gamete Interaction and Fertilization In Vitro in the Cheetah (*Acinonyx Jubatus*). *Biol. Reprod.*, v.46, p.1047 – 1056.

DOOLEY, M.P., PINEDA, M.H. (1986). Effects of method of collection on seminal plasma characteristics of the domestic cat. *Am. j. vet. res.*, v.47, p.286-92.

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

EATON, R. L. (1977). Breeding propagation and biology of the ocelot (*Leopardus pardalis*). *Der Zoologische Garten*, v.47, p.9-23.

EATON, R. L. (1984). Surgery of smaller felid breeding. *Der Zoologische Garten*, v.54, n.1/2, p.101-120.

EILTS, B.E. (2005). Theoretical aspects of canine cryopreserved semen evaluation. *Theriogenology*, v.64, p.685-691.

EIZIRIK, E., KIM, J.H., RAYMOND, M.M., GRAWSHAW JR, P.G., O'BRIEN, S.J., JOHNSON, W.E. (2001). Phylogeography, Population history and conservation genetics of jaguars (*Panthera onca*, Mammalia, Felidae). *Mol. ecol.*, v.10, n.1, p.65-79.

EMMONS, L.H. (1988). A field study of ocelots (*Felis pardalis*) in Peru. The Annual Review of *Ecology*, v.43, p.133-157.

FAGEN, R.M. & WILEY, K.S. (1978). Felid paedomorphosis with special reference to Leopardus. *Carnivore*, v.1, p.72-81.

FOULKES, J.A. (1977). The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on freezing of bovine spermatozoa. *J. reprod. fertil.*, v.49, p.277-284.

GAO, D.Y., LIU, J., LIU, C., MCGANN, L.E., WATSON, P.F., KLEINHANS, F.W., MAZUR, P., CRITSER, E.S., CRITSER, J.K. (1995). Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. *Hum. reprod.*, v.10, p.1109-22.

GOODROWE, K.L. (1992). Feline reproduction and artificial breeding technologies. *Anim. Reprod. Sci.*, v.28, p.389-397.

GREEN, R. (1991). *Wild cat species of the world*. Plymouth, UK: Basset Publications. 163p.

GRUFFYDD-JONES, T.J. Disorders of the reproductive system. (1993). In J. Willis & A. Wolf, *Handbook of Feline Medicine*. Oxford, UK: Pergamon Press. pp.213-222.

HALLAP, T., NAGY, S., JAAKMA, U., JOHANNISSON, A., RODRIGUEZ-MARTINE, H. (2006). Usefulness of a triple fluorochrome combination Merocyanine

540/Yo-Pro 1/Hoechst 33342 in assessing membrane stability of viable frozen-thawed spermatozoa from estonian holstein AI bulls. *Theriogenology*, v.65, p.1122-1136.

HAMMERSTEDT, R.H., GRAHAM, J.K., NOLAN, J.P. (1990). Cryopreservation of Mammalian sperm: what we ask them to survive. *J. androl.*, v.11, n.1, p.73- 87.

HARRISON, R.A.P., VICKERS, S.E. (1990). Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J. reprod. fertil.*, v.88, p.343-352.

HEWITT, D.A., ENGLAND, G.C.W. (1997).The canine oocyte penetration assay: its use as an indicator of dog spermatozoal performance in vitro. *Anim. Reprod. Sci*, v.50, p.123–39.

HOLST, B.S.; LARSSON, B.; LINDE-FORSBERG. C.; RODRIGUEZ MARTINEZ. H. (2000). Sperm binding capacity and ultrastructure of the zona pellucidaof stored canine oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, v.119, p.77-83.

HOLT, W.V. (2000a). Basic aspects of frozen storage semen. *Anim. Reprod. Sci*, v.62, p.3-22.

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

HOWARD, J. G. (1993). Semen collection and analysis in nondomestic carnivores. In: Fowler, M.E. *Zoo and wild animal medicine*. Philadelphia: W.B. Saunders Co. 3rd ed. pp.390-399.

HOWARD, J.G., BROWN, J.L., BUSH, M. AND WILDT, D.E. (1990). Teratospermic and normospermic domestic cats: ejaculate traits, pituitary-gonadal

hormones, and improvement of spermatozoal motility and morphology after swim-up processing. *J Androl.* v.11, p. 204–215.

HOWARD, J.G., BUSH, M., MORTON, C., MORTON, F., WENTZEL, K., WILDT, D.E. (1991b) Comparative semen cryopreservation in ferrets (*Mustela putorius furo*) and pregnancies after laparoscopic intrauterine insemination with frozen–thawed spermatozoa. *J. reprod. fertil.*, v.92, p.109-118.

HOWARD, J.G., BUSH, M., WILDT, D.E. (1986). Semen collection, analysis and cryopreservation in nondomestic mammals. In: Morrow D (ed), *Current Therapy in Theriogenology II*. Philadelphia: W.B. Saunders Co. p. 1047-1053.

HOWARD, J.G.; BUSH, M.; WILDT, D.E. (1991a). Teratospermia in Domestic Cats Compromises Penetration of Zona-Free Hamster Ova and Cat Zonae Pellucidae. *J. Androl.*, v.12, n.1, p.36 – 45.

INTERNACIONAL UNION FOR NATURE CONSERVAION - IUCN. *IUCN Red List of Threatened Species*. Version 2011.2. 2011. Disponível em: <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Acessado em: 06 Mar.2012.

JACOB, A.A. (2002). *Ecologia e conservação da jaguatirica (Leopardus pardalis) no parque estadual Morro do Diabo, Pontal do Paranapanema, SP*. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais), Universidade de Brasília, Brasília-DF. 56p.

JANUSKAUSKAS, A., HAARD, M. G., HAARD, M. C., SODERQUIST, L., LUNDEHEIM, N., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. (1996). Estimation of Sperm Viability in Frozen-Thawed Semen from Swedish A.I. Bulls. *Zentralbl. Veterinarmed., Reihe A.*, v.43, n.5, p.281-287.

JEWGENOW, K., STOLTE, M. (1996). Isolation of preantral follicles from nondomestic cats - viability and ultrastructural investigations. *Reprod. domest. anim.*, v.44, p.183-193.

JOHNSTON, L.A., DONOGHUE, A.M., O'BRIEN, S.J. & WILDT, D.E. (1991a). Rescue and maturation in vitro of follicular oocytes collected from nondomestic felid species. *Biol. reprod.*, v.45, n.6, p.898-906.

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

JOHNSTONE, S.D. (1984). Electroejaculation in the domestic cat. *Aust. vet. j.*, v.61, p. 155–158.

KATKOV, I.T., KATKOVA, N., CRITSER, J.K., MAZUR, P. (1998). Mouse spermatozoa in high concentrations of glycerol. Chemical toxicity vs. osmotic shock at normal and reduced oxygen concentrations. *Cryobiology*, v. 37, p.325-338.

KATSOFF, D.; CHECK, M. L.; CHECK, J. H. (2000). Evidence that Sperm with low hypoosmotic swelling scores cause embryo implantation defects. *Arch. Androl.*, v.44, n.3, p.227 – 230.

LIU, D.Y.; BAKER, H.W.G. (1993). Inhibition of acrosin activity with a Trypsin inhibitor blocks human sperm penetration of the zona pellucida. *Biol. reprod.*, v.48, p.340-48.

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

LOPES, M. D. (2002). Biologia reprodutiva de felinos domésticos (*Felis catus*) e técnicas artificiais de reprodução. In: *Anais II Simpósio Paranaense de Atualização em Reprodução Animal e I Fórum ASBIA de Inseminação Artificial*. Londrina Londrina: CBRA.

LUVONI, G.C., KALCHSCHMIDT, E., LEONI, S., RUGGIERO, C. (2003). Conservation of Feline Semen Part I: Cooling and Freezing Protocols. *J. feline med. surg.*, v.5, n.4, p.203-208.

MANTOVANNI, J. E. (2001). *Telemetria convencional e via satélite na determinação da área de vida de três espécies de carnívoros na região nordeste do Estado de São Paulo*. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP. 133f.

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

MAYENCO-AGUIRRE, A.M., PÉREZ CORTÉS, A.B. (1998). Preliminary results of hemizona assay (HZA) as a fertility test for canine spermatozoa. *Theriogenology*, v.50, p.195-204.

MELLEN, J.D. (1990). *Reproductive behaviour of small captive exotic cats (*Felis* spp.)*. Doctoral Thesis, University California, Davis. 161 p.

MORAIS, R.N. (1999). 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. Tese (Doutorado em Reprodução

Animal), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, SP. 177f.

MORAIS, R.N. (2001). 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. pp.312-316.

MOREIRA, N., MONTEIRO-FILHO, E.L.A., MORAIS, W., SWANSON, W.F., GRAHAM, L.H., PASQUALI, O.L., GOMES, M.L.F., MORAIS, R.N., WILDT, D.E., BROWN, J.L. LENGWINAT, T., BLOTTNER, S. (1994). In vitro fertilization of follicular oocytes of domestic cat using fresh and cryopreserved epididymal spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, v. 35, p.291-301.

MUNSON, L., BROWN, J.L., BUSH, M., PACKER, C., JANSSEN, D., REIZISS, S. M., WILDT, D.E. (1996). Genetic diversity affects testicular morphology in free-ranging lions (*Panthera leo*) of serengeti plains and ngorongoro crater. *J. reprod. fertil.*, v.108, p.11-15.

MURRAY, J. L. & GARDENER, G.L. (1997). Leopardus pardalis. *Mamm. species.*, v.548, p.1-10.

NEILD, D.M., CHAVES, M.G., FLORES, M., MIRAGAYA, M.H., GONZALEZ, E., AGÜERO, A. (2000). The HOST Test and its relationship to fertility in the stallion. *Andrologia*, v.32, n.6, p.351-355.

NELSON, K.L., CRICHTON, E.G., DOTY, L., VOLENEC, D.E., MORATO, R.G., POPE, C.E., ET AL. (1999). Heterologous and Homologous Fertilizing Capacity of Cryopreserved Felid Sperm: a Model for Endangered Species. (Abstract). *Theriogenology*, v.51, p.290.

NIZANSKI, W. (2006). Intravaginal insemination of bitches with fresh and frozen-thawed semen with addition of prostatic fluid: use of an infusion pipette and the Osiris catheter. *Theriogenology*, v.66, p.470-483.

O'BRIEN, M.K., D.R. MCCULLOGH (1985). Survival of Black-Tailed Deer Following Relocation in California. *Journal of Wildlife Management*, v.49, n.1, p.115-119.

OEHNINGER, S., FRANKEN, D., KRUGER, T. (1997). Approaching the next millennium: how should we manage andrology diagnosis in the intracytoplasmic sperm injection era? *Fertil. steril.*, v.67, p.434-436.

OLIVEIRA, T.G. & CASSARO, K. (2005). *Guia de campo dos felinos do Brasil*. Instituto Pró-Carnívoros/Fundação Parque Zoológico de São Paulo/Sociedade de Zoológicos do Brasil/Pró-Vida Brasil, São Paulo, Brasil. PG

OLIVEIRA, T.G., CASSARO, K. (2005). *Guia de campo dos felinos do Brasil*. Instituto Pro -carnivoros, sociedade de Zoologico do Brasil, Fundação Parque Zoológico de São Paulo. 80p.

PEÑA, A.I., LINDE-FORSBERG, C. (2000). Effect of Equex, one or two step dilution and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. *Theriogenology*, v.54, p.859-875.

PEÑA, A.I., LUZ, L.L., BARRIO, M., HERRADÓN, P.G., QUINTQLA, L.A. (2003). Effect of Equex from different sources on post-thaw survival, longevity and intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration of dog spermatozoa. *Theriogenology*, v.59, p.1725-39.

PEÑA-MARTÍNEZ, A.I. (2004). Canine Fresh and Cryopreserved Sêmen Evaluation. *Anim. Reprod. Sci.*, v.82 – 83, p.209 – 224.

PETERSON, R.N., SILVERSTEIN, K., FREUND, M. (1974). A rapid fluorometric method for the determination of DNA in human semen. *J. reprod. fertil.*, v.41, p.485-488.

PLATZ JR., C. C., FOLLIS, T., DEMOREST, N., & SEAGER, S. (1976). Semen collection, freezing and insemination in the domestic cat. *International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination*, 8. Cracow, Poland. pp.1053-1055.

PLATZ, C. C., WILDT, D. E., SEAGER, S. W. J. (1978). Pregnancy in the Domestic Cat After Artificial Insemination with Previously Frozen Spermatozoa. *J. reprod. fertil.*, v.52, p.279 – 282.

PLATZ, C.C., SEAGER, S.W.J. (1978). Semen collection by electroejaculation in the domestic cat. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.173, p.1353-5.

PURSEL, V.G., SCHULMAN, L.L., JOHNSON L.A. (1978). Effect of Orvus ES Paste on acrosome morphology, motility and fertilizing capacity of frozen-thawed boar sperm. *J. anim. sci.*, v.47, p.198-202.

QUEIROZ, V. S. (2003). *Estudo do efeito das condições de manipulação do sêmen de jaguatiricas (Leopardus pardalis Linnaeus, 1758) sobre a capacitação e a integridade morfológica e funcional dos espermatozoides*. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP. 132 f.

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

REIS, G.R., BERNARDI, M.L., WENTZ, I., BORTOLOZZO, F.P., WEITZE, K.F., AMANN, R., KELLERS, C., ZEMMRICH, J. (2003). Fertilidade de sêmen suíno avaliada pelo teste de ligação dos espermatozóides a um substrato sintético. *Pesq. Agro. Bras.*, v.38, n.11, p.1343-1349.

ROTA, A., IGUER-OUADA, M.M VERSTEGEN, J.P., LINDE-FORSBERG, C. (1999). Fertility after vaginal or intrauterine deposition of dog semen frozen in a tris extender with or without Equex STM paste. *Theriogenology*, v.51, p.1045-1058.

ROTA, A., STROM-HOST, B., LINDE-FORSBERG, C., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. (1997). Effects of Equex STM Paste on viability of frozenthawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38°C. *Theriogenology*, v.47, p.1093–1101.

SANTOS, M.C.R. (2010). *Avaliação de métodos alternativos para análises da capacidade de ligação do espermatozóide caprino e estudo do polimorfismo no gene Izumo em caprino, devido à ação do congelamento do sêmen*. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. 54f.

SCOTT, M. A. A. (2000). Glimpse at sperm function in vivo: sperm transport and epithelial interaction in the female reproductive tract. *Anim. reprod. sci.*, v.60-61, p.337-348.

SEAGER, S.W.J., PLATZ JR., C.C. (1976). Semen collection and freezing in captive wild mammals. In: *International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination*, 8º, Cracow. p.1075-1077.

SETCHELL, B.P., MADDOCKS, S., BROOKS, D.E. (1994). Anatomy, vasculature, innervation and fluids of the male reproductive tract. In: Knobil, E., Neill, J. D (eds.). *The physiology of reproduction*. 2.ed. New York: Raven Press, p. 1063-1075.

SILVA, P.F.N., GADELLA B.M. (2006). Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*, v.65, p.958-978.

SINOWATZ, F.; WESSA, E.; NEUMÜLLER, C.; PALMA, G. (2003). On the species specificity of sperm binding and sperm penetration of the zona pellucida. *Reprod. Dom. Anim.*, v. 38, p. 141-146.

SJOBLOM, P., COCCIA, E. (1989). On the Diagnostic Value of the Hypoosmotic Sperm Swelling Test in an In Vitro Fertilization Program. *J. assist. reprod. genet.*, v.6, n.1, p.41-43.

SOJKA, N.J., JENNINGS, L.L. (1970). Collection and Utilization of Cat Semen for Artificial Insemination. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.156, p.1250-1251.

SOUZA, N.L. (2001). *Avaliação de técnicas para determinar a viabilidade e a integridade do acrossomo de espermatozoides criopreservados eqüinos*. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 76p.

SWANSON, W. F., HOWARD, J. G., ROTH, T. L., BROWN, J. L., ALVARADO, T., BURTON, M. ET AL. (1996). Responsiveness of ovaries to exogenous gonadotropins and laparoscopic insemination with frozen-thawed spermatozoa in ocelots (*Felis pardalis*). *J. reprod. fertil.*, v.106, p.87-94.

SWANSON, W. F., JOHNSON, W. E., CAMBRE, R. C., CITINO, S. B., QUIGLEY, K. B., BROUSSET, D. M., et al. (2003). Reproductive status of endemic felid species in latin american zoos and implications for ex situ conservation. *Zoo Biology*, v.22, n.5, p.421-441.

SWANSON, W.F. (1998). Curso de Extensão – felinos selvagens. In: *Biotécnicas reprodutivas e conservação*. Curitiba, PR: Setor de Ciências Biológicas, UFPR. pp.5-10.

SWANSON, W.F., BROWN, J.L. (2004). International Training Programs in Reproductive Sciences for Conservation of Latin American Felids. *Anim. reprod. sci.*, v.82-83, p.21-34.

SWANSON, W.F., WILDT, D.E., CAMBRE, R.C., CITINO, S.B., QUIGLEY, K.B., BROUSSET, D., MORAIS, R.N., MOREIRA, N., O'BRIEN, S.J., JOHNSON, W.E. (1995). Reproductive survey of endemic felid species in Latin American zoos: male reproductive status and implications for conservation. In: *Joint conference american association of zoo veterinarians*, Houston. Proceedings. Houston. p.374-80.

TARDIF, S., LAFOREST, J.P., CORMIER, N., BAILEY, J.L. (1999). The importance of porcine sperm parameters on fertility in vivo. *Theriogenology*, v.52, p.447-459.

TEBET, M.J. (2004). Efeito da criopreservação sobre a célula espermática em três espécies de felinos: o gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), a jaguatirica (*Leopardus pardalis*) e o gato doméstico (*Felis catus*). Tese (Doutorado em Reprodução Animal)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu. 145f.

TSUTSUI, T., HASE, M., HORI, T., KOMORIYA, K., SHIMIZU, N., NAGAKUBO, K., KAWAKAMI, E. (2000). Effect of addition of Orvus ES Paste to frozen canine semen extender on sperm acrosomes. *J. Vet. Med. Sci*, v.62, p.537-538.

VERSTEGEN, J., IGUER-OUADA, M., ONCLIN, K. (2002). Computed assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, v.57, p.140-179.

WATSON, P.F. (1979). The Preservation of Semen in Mammals. *Oxf. rev. reprod. biol.*, v.1, p.283-350.

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

WATSON, P.F. (2000). The Causes of Reduced Fertility with Cryopreserved Semen. *Anim. Reprod. Sci.*, v.60-61, p.481 – 492.

WILDT, D. E., BROWN, J. L., BUSH, M., BARONE, M. A., COOPER, K. A., GRISHAM, J., HOWARD, J. G. (1993). Reproductive Status of Cheetahs (*Acinonyx Jubatus*) in North American Zoos: the Benefits of Physiological Surveys for Strategic Planning. *Zoo Biology*, v.12, n.1, p.45-80.

WILDT, D. E., BUSH, M., GOODROWE, K. L., PACKER, C., PUSEY, A. E., BROWN, J. L., et al (1987). Reproductive and Genetic Consequences of Fouding Isolated Lion Populations. *Nature*, v.329, n.6137, p.328-331.

WILDT, D. E.; BUSH M.; HOWARD J. G.; O'BRIEN S. J.; MELTZER D.; VAN DYK A.; et al. (1983). Unique Seminal Quality in the South African Cheetah and a Comparative Evaluation in the Domestic Cat. *Biol. reprod.*, v.29, p.1019 – 1025.

WILDT, D.E. (1989). Strategies for the practical application of reproductive technologies to endangered species. *Zoo Biology Supplement*, v.1, p, 17-20.

WISHART, G.J. (1997). Quantitative aspects of sperm-egg interaction in chickens and turkeys. *Anim. reprod. sci.*, v.48, p.81-92.

YANAGIMACHI, R. (1994). Mammalian Fertilization. In: Knobil, E., Neill, J. D. (Eds.), *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press. pp. 189-317.

ZAMBELLI, D., BELLUZZI, S. (1998). Raccolta e Valutazione del Materiale Seminale di Gatto. *Praxis Veterinaria*, v.1, p.20-22.

ZAVOS, P.M. (1990). Hyposmotic Swelling Test (HOS)/ Functional Integrity of Sperm Mebranes. *J. assist. reprod. Tech.*, v.2, p.215-216.

**4. ARTIGO: Uso de sondas fluorescentes e ensaio de ligação a ovócitos heterólogos e membrana perivitelínica de ovo de galinha (*Gallus gallus*) para a avaliação de espermatozoides frescos e descongelados de jaguatirica (*Leopardus pardalis*).**

**RESUMO**

Objetivou-se a validação do uso de combinação de sondas fluorescentes e do teste de ligação à zona pelúcida de ovócitos heterólogos criopreservados e à membrana perivitelínica de ovo de galinha na qualificação de sêmen fresco e descongelados de jaguatiricas. Foram usadas três jaguatiricas mantidas em cativeiro, sendo obtidos ejaculados por meio de eletroejaculação e avaliados por testes clássicos de rotina. Através destes testes (vigor e motilidade espermáticos, hiposmótico e morfologia) observou-se queda ( $p < 0,05$ ) dos padrões qualitativos do sêmen descongelado em relação ao sêmen fresco. A associação das sondas Iodeto de Propídeo, Hoechst 33342 e Pisum Sativum Agglutinin conjugada com Lectina Fluorescente (FITC-PSA), permitiu a identificação de subpopulações espermáticas de acordo com a localização específica de lesões celulares e detectou de forma mais acurada o efeito deletério da criopreservação no sêmen. O uso de ovócitos criopreservados de gatas domésticas permitiu a observação da queda da capacidade ligante ( $p < 0,05$ ) dos espermatozoides descongelados em relação aos espermatozoides a fresco de jaguatiricas, havendo ainda correlação entre o total de ligantes nas amostras de espermatozoides a fresco com padrões qualitativos no sêmen após o descongelamento. A combinação de sondas fluorescentes utilizadas e o uso de ensaio de ligação a ovócitos heterólogos criopreservados de gatas domésticas foram mais específicos e confiáveis na detecção da queda na qualidade espermática de jaguatiricas após o descongelamento. Os espermatozóides de jaguatiricas também foram capazes de se ligar à membrana perivitelínica em ambos os tratamentos. Apesar de não observada diferença na quantidade de espermatozóides ligados nos tratamentos ( $p > 0,05$ ), houve correlação

positiva ( $r= 0,91$ ;  $p<0,05$ ) entre eles. Apesar dos espermatozoides de jaguatirica terem se ligado de forma satisfatória à membrana perivitelínica, o reduzido número de amostras avaliadas não permitiu demonstrar correlação com a fertilidade do espermatozoide.

Palavra - chave: Iodeto de Propídeo; Hoechst 33342; FITC-PSA; criopreservação; felinos

### **ABSTRACT**

We aimed to validate the combination of fluorescent probes and the egg-binding assay with cryopreserved oocytes and with chicken perivitelline membrane in the qualification of fresh and frozen-thawed ocelot semen. Were used three captive ocelots for semen collection by electroejaculation. The semen was evaluated by conventional tests routine. Through these tests (motility and sperm progressive motility, hypoosmotic swelling test and morphology) a decrease ( $p <0.05$ ) of the quality standards of the frozen-thawed semen compared to fresh semen was observed. The combination of the probes propidium iodide, Hoechst 33342 and Pisum sativum Agglutinin lectin conjugated to fluorescent (FITC-PSA) allowed the identification of sperm subpopulations according to the specific location of cell damage at the same time allowing a more accurate detection of the deleterious effect of semen cryopreservation in ocelots. The use of cryopreserved oocytes of domestic cats allowed the observation of the fall of binding capacity ( $p <0.05$ ) of frozen-thawed sperm compared to fresh ocelot spermatozoa, and there was a correlation between total binding in fresh semen with the quality standards in frozen-thawed semen. The combination of fluorescent probes used and the use of binding sperm-egg binding assay with cryopreserved heterologous oocytes from domestic cats were more specific and reliable in detecting the decrease in ocelot's sperm quality after thawing. The ocelot sperm also were able to bind the perivitelline membrane, in both treatments. Although there is no difference in the amount of bound

sperm in treatments ( $p>0.05$ ), there was a positive correlation ( $r=0.91$ ;  $p<0.05$ ) between them. Although ocelots spermatozoa have bound satisfactorily to perivitelline membrane, the small number of sample could not demonstrate correlation with the sperm fertility. However, the device developed for the membrane allowed the upkeep of its stretch during processing and defined an evaluation area. Thus, future studies, with a larger sample are needed for effective validation of this technique.

Key-words: propidium iodide; Hoechst 33342; FITC-PSA; criopreservação; felino

#### 4.1. Introdução

A jaguatirica (*Leopardus pardalis*) é uma espécie de felino neotropical de médio porte, com peso médio de 11Kg (Oliveira & Cassaro, 2005). Esta espécie está listada no Apêndice 1 da CITES (CITES, 2012) e classificada pela IUCN como *Least Concern* (IUCN, 2011), porém no Brasil, as populações de jaguatirica extra-amazônica são consideradas como vulneráveis (Machado *et al.* 2005).

Os principais programas de reprodução assistida com finalidade conservacionista incluem procedimentos para criopreservação de sêmen, que permitem a formação de bancos de germoplasma. Porém, os protocolos de congelamento de sêmen imprimem uma série de danos à membrana e à fisiologia da célula espermática (Watson, 2000), promovendo uma perda de viabilidade, mesmo com o uso de meios diluentes adicionados de crioprotetores, tampões, energéticos, etc. Embora haja uma constante busca por componentes que possam melhorar a qualidade do processo de criopreservação, tal como os surfactantes a base de SDS (dodecil sulfato de sódio; Equex STM Paste<sup>®</sup> e Ovos Paste<sup>®</sup>) que permitem aumento na viabilidade espermática (Arriola & Foote 1987; Rota *et al.* 1997), todos os procedimentos de congelamento induzem mudanças na composição dos lipídios, fluidez e permeabilidade da membrana plasmática e alterações na membrana acrossomal (Januskauskas *et al.* 2003).

A acurada avaliação da qualidade espermática permite experimentações no desenvolvimento de protocolos mais eficientes e a predição da viabilidade fertilizante do sêmen descongelado. Análises de rotina como vigor, motilidade espermática, teste hiposmótico e morfologia espermática apesar de bons indicadores da função espermática (Peña-Martinez, 2004), podem ser influenciadas pela sua natureza subjetiva e variação de técnica, necessitando de análises complementares (Celeghini, 2005). O

uso de sondas fluorescentes ou fluorocromos isoladas ou em combinações possibilita uma análise mais criteriosa da integridade estrutural dos componentes dos espermatozoides, devido a sua característica de marcação estruturas específicas das células e detectar a integridade estrutural e funcional de forma clara (Silva & Gadella, 2006). Devido a isso, muitas sondas fluorescentes vêm sendo utilizadas para examinar a integridade e a viabilidade espermática com o auxílio da microscopia fluorescente ou citometria de fluxo. Embora o uso de sondas fluorescentes já tenha sido reportado em estudos com sêmen de jaguatirica (Queiroz, 2003; Tebet, 2004; Baudi, 2005), a combinação de Iodeto de Propídeo com Hoechst 33342 e Isotiocianato de Fluoresceína conjugada com *Pisum sativum* (FITC-PSA) ainda não foi descrita para a espécie.

Embora o teste definitivo da viabilidade espermática seja a fertilização *in vivo*, testes de interação de gametas podem quantificar a capacidade ligante mimetizando assim a capacidade fertilizante *in vitro*. Deste modo, testes de interação entre gametas, homólogos e heterólogos, são de grande importância na avaliação de técnicas de criopreservação de sêmen (Cardoso et al., 2005). Estes testes possuem como vantagem, em relação à fertilização *in vitro*, a menor demanda de tempo, uma vez que não requer a maturação ovocitária (Hewitt & England, 1997). Os ovários de animais domésticos são de fácil obtenção e permitem a criopreservação por técnicas simples, permitindo estoque de ovócitos sem perda na taxa de interação com espermatozoides *in vitro* (Gheller et al., 2009).

Neste sentido, objetivou-se validar o uso de combinação de sondas fluorescentes e teste de ligação à zona pelúcida de ovócitos heterólogos criopreservados na qualificação de sêmen frescos e descongelados de jaguatiricas.

## 4.2. Material e métodos

### 4.2.1 Animais

Foram usados três machos de jaguatiricas adultos (ambos com aproximadamente sete anos) mantidos no Centro de Triagem de Animais Silvestres da Universidade Federal de Viçosa (CETAS-UFV) (Coordenadas: Zona 23k; 721471,15, E; 7703581,52,S). Os animais são mantidos em recintos individuais (24 m<sup>2</sup>), recebendo alimentação diária a base de presas vivas (ratos de laboratório, coelhos e galinhas) e de vísceras de bovinos e suínos e com água *ad libitum*. A presente experimentação obteve

autorização do Instituto Chico Mendes (Protocolo: 29289) e da Comissão de Ética para Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (CEUA – UFV) (Protocolo: 99/2011).

#### 4.2.2. *Coleta e processamento do sêmen*

Cada coleta foi realizada com intervalo mínimo de duas semanas, para reduzir os efeitos prejudiciais causados pela anestesia. O sêmen foi coletado por eletroejaculação conforme Ávila, (2009). Os animais foram contidos quimicamente pelo uso de dardos anestésicos, projetados por rifle de ar comprimido, com a associação de cloridrato de quetamina (10 mg/kg, Dopalen<sup>®</sup>, Vetbrands, SP-Brasil) e cloridrato de xilazina (2 mg/kg, Anasedan<sup>®</sup>, Vetbrands, SP-Brasil) via intra muscular (Ávila, 2009). Os animais tiveram seus parâmetros vitais aferidos e monitorados por um médico veterinário utilizando um monitor multiparamétrico. Após o procedimento de coleta de sêmen a anestesia foi revertida utilizando Ioimbina na dose de 0,5 mg/kg, (Citopharma), propiciando uma recuperação pós-anestésica rápida e segura.

Após a contenção química, foi realizado o exame andrológico, para o qual foi avaliada a consistência testicular, classificada como firme, elástica, ligeiramente flácida, flácida e muito flácida, e as características das espículas penianas avaliadas. O tamanho das espículas foi avaliado por comparação com jaguatiricas anteriormente estudadas pela equipe.

Previamente à coleta do sêmen foi realizado o esvaziamento da bexiga com sonda uretral estéril e seringa de 10 mL e posterior lavagem da bexiga com solução fisiológica estéril aquecida a 38°C. O sêmen foi coletado com auxílio de um aparelho de eletroejaculação (Atojac<sup>®</sup>, Neovet, Brasil), equipado com um transdutor retal, de 2,5cm de diâmetro, com três eletrodos longitudinais. O transdutor foi lubrificado e uma

extensão de aproximadamente 12 cm foi introduzida no reto do animal, sob leve pressão e com os eletrodos voltados ventralmente. O pênis foi exposto e aproximado a um tubo plástico graduado de 1,5mL (*Eppendorf*®) previamente aquecido a temperatura de 38°C, o qual era substituído cada vez que o animal ejaculava.

Para a realização experimental foi usado sêmen a fresco e sêmen descongelado em que foi comparada a avaliação espermática de rotina (Vigor, Motilidade, Teste hiposmótico e Patologia espermática), a avaliação da integridade da membrana plasmática e acrossomal utilizando sondas fluorescentes e o testes de ligação de espermatozoide em zona pelúcida de ovócitos de gata e em membrana perivitelínica de ovo de galinha.

#### *4.2.3. Avaliação espermática*

O sêmen foi avaliado quanto a coloração e aspecto do ejaculado. O volume do ejaculado foi aferido com auxílio de micropipetas de volume ajustável, desconsiderando para tal, os ejaculados aspérmicos ou oligospérmicos. O ejaculado foi pré diluído com 20 µl em meio a base de TRIS-citrato com 20% de gema de ovo, sem glicerol (Nutricell®, Brasil).

Para avaliar a motilidade e o vigor espermático, uma alíquota de sêmen foi depositado diretamente sobre lâmina e lamínula, mantidas a 38 °C, e observado em microscópio óptico (400x). A avaliação foi realizada subjetivamente e expressa em porcentagem para a motilidade espermática, e escores de zero a cinco para o vigor.

Para o cálculo da concentração (espermatozoides/mL) o sêmen foi diluído em água destilada na proporção 1:100 e uma alíquota desta diluição foi depositada em câmara de Neubauer espelhada, para contagem dos espermatozoides em microscópio óptico (400x). A concentração (C) foi determinada pela fórmula ( $C = \text{número de}$

espermatozoides  $\times 5 \times 10^6$ ). Para calcular a concentração de espermatozoides móveis (CM) por mL de ejaculado, multiplicou-se a concentração pela motilidade espermática e para calcular o total de espermatozoides móveis por ejaculado (TE) multiplicou-se a concentração pelo volume. Nas análises espermáticas subsequentes, o sêmen foi diluído para  $40 \times 10^6$  espermatozoides móveis/ml em meio a base de TRIS-citrato com 20% de gema de ovo e sem glicerol.

A determinação das patologias espermáticas foi realizada com uma alíquota do sêmen fixada em fixador Karnovisk (1:10), onde 200 células foram classificadas utilizando um microscópio de contraste de fase em aumento de 1000 vezes. Foram contabilizadas todas as patologias encontradas em cada célula. Todas as análises e procedimentos para avaliação de sêmen seguiram as recomendações do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998).

Para o teste hiposmótico uma alíquota de 5  $\mu$ L de sêmen foi adicionada a 20  $\mu$ L de solução hiposmótica contendo sacarose e H<sub>2</sub>O miliq, a 100 mOsmol/Kg (Melo e Henry, 1999). Após 30 min de incubação a 38 °C foi adicionado 0,5 mL do fixador Karnovisk. A contagem foi realizada em microscópio de contraste de fase em preparação úmida, sendo contadas 200 células no aumento de 1.000 vezes. Foram consideradas como reativas ao teste as células com enrolamento ou dobramento de cauda. O valor bruto de espermatozoides reativos foi corrigido excluindo-se da população total a parcela com as mesmas características contabilizadas no teste de patologia (Melo & Henry, 1999).

Para a avaliação das membranas plasmática e acrossomal foi usada a associação de três sondas fluorescentes, o iodeto de propídio (IP), o Hoechst 33342 (H342) e aglutinina Pisium Sativum conjugada com Isotiocionato de Fluoresceína (FITC-PSA). Para isso, foram adicionadas 2  $\mu$ L de IP (0,5mg/mL em DPBS), 10  $\mu$ L de Hoechst 33342 (25  $\mu$ g/mL em DPBS) e 60  $\mu$ L de FITC-PSA (100  $\mu$ g/mL em DPBS) (Celeghini,

2005, Csermak Jr, 2011) em microtubo contendo 10  $\mu$ L do sêmen. O sêmen foi incubado por 8 minutos a 38°C, mantido sob escuro, e uma gota foi visualizada em microscópio de epifluorescência com filtro de excitação (365 nm) e filtro de barreira (410 nm) (Nikon) nos aumentos de 400 e 1.000 vezes. Foram contabilizadas 200 células por análise e os resultados expressos em número de células coradas. Nos ejaculados analisados as subpopulações foram classificadas conforme descrito por Csermak Jr (2011):

**II** - Membrana plasmática íntegra e membrana acrossomal íntegra (apenas o núcleo emitindo fluorescência em azul)

**IL** - Membrana plasmática íntegra e membrana acrossomal lesada (o núcleo emitindo fluorescência em azul e a região acrossomal emitindo fluorescência verde)

**LI** - Membrana plasmática lesada e membrana acrossomal íntegra (apenas o núcleo emitindo fluorescência vermelha)

**LL** - Membrana plasmática lesada e membrana acrossomal lesada (o núcleo emitindo fluorescência vermelha e a região acrossomal emitindo fluorescência verde)

#### *4.2.4. Teste de ligação de espermatozóides a zona pelúcida de ovócito de gata doméstica*

Os ovários de gatas domésticas foram obtidos de ovariectomias eletivas no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Viçosa e foram mantidos em soro fisiológico e congelados a - 20 °C até serem processados (Holst et al., 2000). Para obtenção dos ovócitos, os ovários foram seccionados com lâmina de bisturi após o descongelamento. Este procedimento foi realizado no interior de uma capela de fluxo laminar em placa de petri contendo meio Talp-Hepes modificado (Costa et al, 1997). Usando um microscópio estereoscópico os ovócitos foram recuperados e transferidos para uma segunda placa contendo o mesmo meio, onde foram desnudados conforme técnica desenvolvida por Costa (1994).

Os ovócitos coletados foram colocados em dois poços totalizando de 15 a 20 ovócitos por poço, com 400  $\mu\text{L}$  de meio de manutenção TCM 199 modificado (Costa et al, 1997). Uma alíquota de sêmen de 100 $\mu\text{L}$  foi submersa três vezes em nitrogênio líquido seguidas de reaquecimento em banho Maria a 38 °C, para morte celular e utilizada como controle de ligação. Os ovócitos foram levados para incubação em estufa a 38°C com pressão atmosférica de 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade relativa por 30 minutos, visando à estabilização das células. Após esse período um dos poços recebeu 20  $\mu\text{L}$  de sêmen, com a concentração de  $0,5 \times 10^6$  espermatozoides móveis/mL e o outro poço recebeu a mesma quantidade e concentração do sêmen controle.

Com 30 minutos de incubação, foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  da sonda fluorescente Hoechst 33342 e homogeneizado por meio de movimentos circulares. Aos 50 minutos de incubação foram adicionados 20  $\mu\text{L}$  de Iodeto de Propídio e novamente feita a homogeneização (Csermak Jr, 2011). Estes procedimentos foram realizados em ambiente escuro e sob placa aquecedora a 38 °C. Após 60 minutos de incubação, os ovócitos foram lavados quatro vezes em meio Talp-Hepes modificado (Costa et al, 1997). Em seguida foi efetuada a montagem das lâminas para a visualização em microscópio de epifluorescência (Nikon). Todas as células espermáticas ligadas à zona pelúcida foram contadas.

#### *4.2.5. Ensaio de ligação de espermatozóides em membrana perivitelínica de ovos de galinhas*

Os ovos utilizados na experimentação foram frescos (postura realizada no mesmo dia da experimentação) e não embrionados. A preparação da membrana perivitelina teve início na separação entre a clara e a gema do ovo. Após este procedimento, a gema intacta foi acondicionada em placa de Petri e seccionada com uma tesoura oftálmica. Por este orifício, parte da gema foi succionada, com o auxílio de uma seringa de 10 mL, e posteriormente injetou-se soro fisiológico até a completa remoção de gema, ficando a membrana totalmente transparente. A membrana limpa foi transferida para outra placa de Petri contendo meio TALP modificado (Costa, 1997), onde foi feita uma última lavagem com meio TALP e realizada a montagem da membrana em um suporte de silicone. Assim, a membrana foi acondicionada sobre halo de silicone vazado com

diâmetro interno de 4 mm e diâmetro externo de 8mm, encaixado perfeitamente em halo de diâmetro interno de 8 mm, ficando a membrana fixa e com a área a ser lida totalmente exposta e devidamente esticada (Figura 1) (Csermak Jr, 2011). A leitura foi feita na área total exposta. Os procedimentos de incubação e coloração com sondas fluorescentes procederam como descrito para o ensaio de ligação com ovócitos.

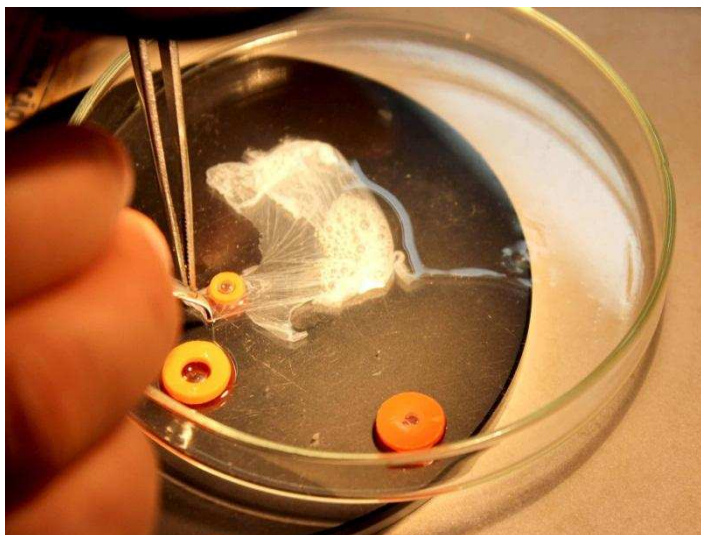


Figura 1: Preparo da membrana perivitelínica de ovo de galinha, em suporte, para ensaio de ligação com espermatozoides de jaguatiricas.

#### 4.2.6. Criopreservação espermática

Para a criopreservação, amostras do sêmen na concentração de  $40 \times 10^6$  espermatozoides móveis/mL foi rediluído em meio a base de TRIS citrato com glicerol a 12% e equex a 1% (1:1), resultando em uma concentração final de 6% glicerol, 0,5% de equex e  $20 \times 10^6$  espermatozoides móveis/mL. As amostras foram envasadas em palhetas francesas de 0,25 mL. Para obter uma taxa de resfriamento de  $-0,55^\circ\text{C}/\text{min}$ , foi utilizada a metodologia descrita por Bueno et al.,(2001) modificada (Ávila, 2009). Após uma semana os espermatozoides foram descongelados por imersão em água a  $38^\circ\text{C}$  por sete segundos e em seguida foram avaliados da mesma forma que o sêmen a fresco.

#### *4.2.7. Análise estatística*

Os dados obtidos na análise de sêmen a fresco e descongelado foram analisados quanto sua normalidade (teste de Lilliefors) e homogeneidade (teste de Cochran e Bartlett). Aqueles dados que não atenderam às premissas de normalidade e/ou homogeneidade foram transformados e reavaliados. Os dados que atenderam às premissas de normalidade e homogeneidade foram submetidos à análise de variância pelo Teste F a 5% de significância. Os dados qualitativos (vigor) foram analisados pelo teste não paramétrico de Wilcoxon. As correlações entre e dentre tratamentos a fresco e descongelado foram obtidas por Correlação Simples de Pearson. As análises foram realizadas com uso do software SAEG 9.1 UFV, 2007.

#### *4.3. Resultados e Discussão*

O protocolo de eletroejaculação usado mostrou-se eficiente, uma vez que todos os animais responderam aos estímulos com a distensão simétrica dos membros pélvicos, ereção e ejaculação (Tab. 1). A contaminação por urina é bastante relatada nas coletas de sêmen em felinos, principalmente associada à aplicação de estímulos com altas voltagens e o posicionamento mais cranial da probe (Pineda & Dooley, 1984; Howard, 1993). Apesar desse trabalho não ter mensurado o pH das amostras, devido ao pequeno volume de sêmen ejaculado, o fato de ter sido esvaziado a bexiga e realizada sua lavagem, diminuiu consideravelmente a presença de urina nas amostras.

Tabela 1. Média  $\pm$  Desvio Padrão do peso corporal, volume do ejaculado (Vol)\*, concentração espermática (CE), total de espermatozoides por ejaculado (TE), vigor, motilidade espermática e índice de motilidade espermática (IME) de jaguatiricas mantidas em cativeiro.

	Total
Peso (Kg)	13,3 $\pm$ 0,1
Vol (mL)	0,4 $\pm$ 0,2
CE (x 10 <sup>6</sup> sptz/mL)	226,4 $\pm$ 74,2
TE (x 10 <sup>6</sup> sptz/coleta)	79,9 $\pm$ 23,9
Vigor	4,3 $\pm$ 0,3
Motilidade espermática (%)	85,0 $\pm$ 6,5
IME	86,3 $\pm$ 4,9

\*Método: eletroejaculação

Embora a média do volume do ejaculado de jaguatirica (0,4 ml) obtido no presente experimento ser inferior ao observado por alguns autores Baudi (2005) 0,66 ml, Tebet (2004) 0,60 ml, Queiroz (2003) 0,68 ml, Morais et al (2002) 1,40 ml e Ávila (2009) 0,62 ml, a concentração espermática obtida (226,4x 10<sup>6</sup> sptz/ml; Tab. 1) foi inferior apenas aos registrados por Queiroz (2003) (283,4 x 10<sup>6</sup> sptz/ml).

Os valores de vigor e motilidade espermática representam bons indicadores da função do espermatozoide, uma vez que a movimentação é uma manifestação dos componentes estruturais e funcionais do espermatozoide e elevada correlação com a taxa de fertilidade, normalidade morfológica e integridade da membrana espermática (Oettlé, 1993; Peña-Martinez, 2004; Thomassen et al., 2006). A média do vigor e da motilidade espermática obtida no sêmen a fresco no presente experimento se mostraram de boa qualidade (4,3; 85,0%, respectivamente; Tab. 1).

A quantificação de espermatozoides defeituosos em um ejaculado é um parâmetro relevante na avaliação da viabilidade do sêmen, a teratospermia (porcentagem menor que 40% de espermatozoides normais, (Pukazhenthil et al., 2001; Neubauer et al., 2004), é frequentemente observada em ejaculados de felídeos, incluindo certas raças de gatos domésticos, mas os mecanismos celulares e moleculares que provocam este fenômeno são desconhecidos (Neubauer et al., 2004). Espécies silvestres comumente produzem mais de 40% de espermatozoides anormais por

ejaculado, um achado relacionado com a redução na variabilidade genética (Wildt et al., 1983; Howard, 1993). Leões machos isolados geograficamente possuem menor variabilidade genética e maior porcentagem de espermatozoides anormais, comparando-se com indivíduos não isolados geograficamente (Wildt et al., 1987; O'brien et al., 1987).

No presente experimento, a média de espermatozoides anormais observado no sêmen a fresco de jaguatiricas ( $52,5 \pm 14,0$ ; Tab. 2) foi maior em relação a encontrada pela maioria dos autores nesta espécie (Morais et al., 2002; Queiroz, 2003; Tebet, 2004; Baudi, 2005; e Ávila, 2009). As patologias espermáticas podem ser classificadas de acordo com a fertilidade como defeitos maiores e defeitos menores (Blom, 1973). No presente experimento foi observado 14,4% de espermatozoides com defeitos maiores e 38,1% de defeitos menores no sêmen a fresco (Tab. 2), valores próximos foram verificados por Ávila (2009) e Tebet (2004). Elevadas concentrações de patologias espermáticas causam efeito negativo na interação de gametas *in vitro* (Howard et al., 1991). Long et al. (1996) observaram que espermatozoides de gatos domésticos teratospérmicos, se capacitaram *in vitro* mais tardiamente e não são eficientes em completar a reação acrossomal em relação aos dos animais normospérmicos.

A funcionalidade normal da membrana é essencial para que ocorra a fertilização sendo, portanto, um importante parâmetro seminal a ser avaliado. O teste hiposmótico (HOST) nos permite obter uma avaliação simples da integridade da membrana plasmática uma vez que consiste na reação de enrolamento/dobramento de cauda frente a meios com osmolaridade inferior ao do espermatozoide (Ávila, 2009). Amostras de sêmen com valores baixos para este teste (<50%) fertilizam ovócitos *in vivo* a uma taxa normal, porém, os embriões formados possuem baixa capacidade de implantação (Check et al., 1995; Katsoff et al., 2000).

Tabela 2. Médias  $\pm$  desvio padrão (coeficiente de variação) de parâmetros espermáticos de sêmen a fresco e descongelado de três jagatiricas mantidas em cativeiro.

	Sêmen a fresco	Sêmen descongelado
Vigor*	4,3 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup> (6,2)	2,1 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup> (16,7)
Motilidade espermática**	85,0 $\pm$ 6,5 <sup>a</sup> (7,6)	25,0 $\pm$ 12,6 <sup>b</sup> (50,3)
Patologias totais**	52,5 $\pm$ 14,0 <sup>b</sup> (26,6)	76,9 $\pm$ 6,9 <sup>a</sup> (9,0)
Defeitos maiores**	14,4 $\pm$ 6,9 <sup>b</sup> (50,7)	29,7 $\pm$ 7,5 <sup>a</sup> (25,3)
Defeitos menores**	38,1 $\pm$ 8,6 <sup>b</sup> (22,6)	48,4 $\pm$ 12,4 <sup>a</sup> (25,7)
Teste hiposmótico**	48,9 $\pm$ 15,6 <sup>a</sup> (32,0)	14,3 $\pm$ 9,3 <sup>b</sup> (65,0)
LI**	29,1 $\pm$ 9,8 <sup>a</sup> (33,7)	68,8 $\pm$ 31,5 <sup>b</sup> (45,8)
II**	70,3 $\pm$ 9,2 <sup>a</sup> (13,1)	13,2 $\pm$ 8,3 <sup>b</sup> (62,8)
LL**	0,6 $\pm$ 1,5 <sup>a</sup> (264,6)	3,7 $\pm$ 4,6 <sup>a</sup> (122,8)
IL**	0 $\pm$ 0 (0,0)	0 $\pm$ 0 (0,0)
TSO**	20,0 $\pm$ 19,3 <sup>a</sup> (96,9)	16,9 $\pm$ 18,0 <sup>b</sup> (107,0)
TSOM**	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup> (0,0)	0,25 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup> (84,9)
TSM**	42,00 $\pm$ 18,51 <sup>a</sup> (44,08)	38,50 $\pm$ 19,39 <sup>a</sup> (50,38)

\*Colunas com letras diferentes diferem ( $p < 0,01$ ) pelo teste de Wilcoxon.

\*\* Colunas com letras diferentes diferem ( $p < 0,05$ ) pelo Teste F.

LI: Membrana plasmática lesada e acrossoma íntegro / II: Membrana plasmática e acrossomal íntegros / LL: Membrana plasmática e acrossomal lesados / IL: Membrana plasmática íntegra e membrana acrossomal lesada / TSO: Total de espermatozoides ligados na zona pelúcida de ovócitos / TSOM: Total de espermatozoides no sêmen controle ligados na zona pelúcida de ovócitos.

O processo de criopreservação provoca danos aos espermatozoides, diminuindo seus parâmetros qualitativos e conseqüentemente a capacidade de fertilização (Villaverde & Lopes, 2007). Os danos causados pela criopreservação foram demonstrados, no presente experimento, pelas reduções ( $p < 0,05$ ) no vigor espermático, na motilidade espermática e das células reativas no teste HOST, e também pelo aumento ( $p < 0,05$ ) no percentual de patologias totais, defeitos maiores e defeitos menores em relação ao sêmen a fresco (Tab. 2).

No presente trabalho, a associação das sondas IP, H342 e FITC-PSA mostrou-se eficaz para a distinção de diferentes populações de espermatozoides em um mesmo ejaculado (Fig. 2). O H342 mostrou-se eficiente no papel de contra corante do IP. No entanto, devido ao reduzido tamanho do acrossoma de jagatiricas, assim como de outros felinos (Donoghue et al., 1992; Howard, 1993), houve dificuldade em se identificar a coloração pelo FITC-PSA em associação com o H342.

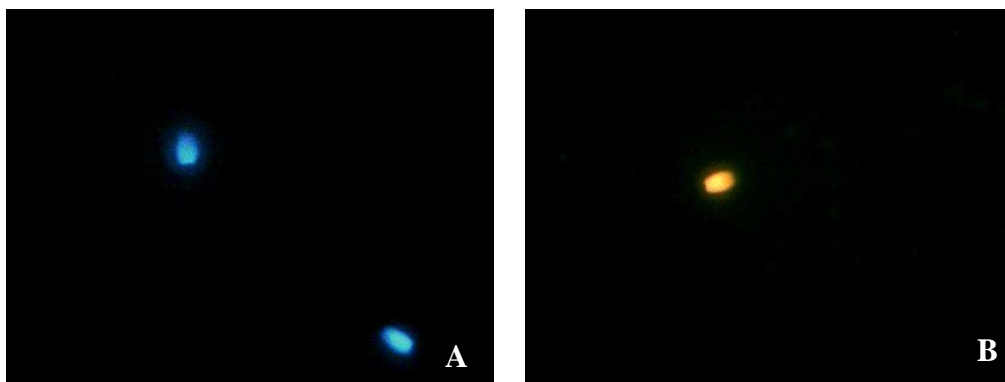


Figura 2: Espermatozoides de jaguatiricas corados com as sondas fluorescentes Hoechst 33342 (A) e Iodeto de propídeo (B) (aumento 400x).

A criopreservação de espermatozoides induz uma série de modificações estruturais nas membranas plasmáticas e acrossomal devido a redistribuição dos fosfolípidos, a remoção do colesterol, etc (Langlais & Roberts, 1985; Lin & Kan, 1996). A análise da integridade morfofuncional das membranas plasmática e acrossomal demonstrou redução ( $p < 0,05$ ) da população com membrana plasmática e acrossomal íntegras (II) no sêmen descongelado em relação ao a fresco (Tab. 2). Houve ainda, um aumento na população com membrana plasmática lesionada e acrossomal íntegra (LI) no sêmen descongelado em relação ao a fresco, que foi inversamente proporcional à motilidade espermática entre estes dois tratamentos (Tab. 2). Csermak-Jr. (2011), usando a mesma combinação de sondas em sêmen de cães, observou significância ( $p < 0,05$ ) no aumento da população LL no sêmen descongelado em relação ao semen fresco e conseguiu identificar a população IL. Em jaguatiricas do presente experimento foi observada correlação positiva da população II com o vigor ( $r = 0,7$ ;  $p < 0,05$ ), com motilidade espermática ( $r = 0,9$ ;  $p < 0,05$ ) e alta correlação negativa da população II ( $r = -1,0$ ;  $p < 0,05$ ) com a população LI, todas no sêmen a fresco, além de correlação negativa ( $r = -1,0$ ;  $p < 0,05$ ) com os defeitos maiores encontrados no sêmen descongelado. No sêmen descongelado a população II obteve alta correlação negativa ( $r = -0,9$ ;  $p < 0,05$ ) com a população LI e correlação negativa ( $r = -0,7$ ;  $p < 0,05$ ) com a patologia encontrada no sêmen a fresco. A população LI no sêmen a fresco obteve correlação negativa com o

Vigor ( $r = -0,7$ ;  $p < 0,05$ ) e Motilidade ( $r = -0,8$ ;  $p < 0,05$ ), ambos a fresco, e correlação positiva com defeitos maiores no sêmen a fresco e no sêmen descongelado ( $r = 0,7$ ;  $p < 0,05$ ;  $r = 0,7$ ;  $p < 0,05$ , respectivamente). Foi obtida correlação negativa da população LL no sêmen descongelado com a motilidade espermática do sêmen a fresco ( $r = -0,9$ ;  $p < 0,05$ ) e correlação positiva com a patologia do sêmen descongelado ( $r = 0,7$ ;  $p < 0,05$ ).

A fertilização *in vitro* é uma ferramenta valiosa para se avaliar a função do espermatozoide (Wildt et al., 1992). Em felinos silvestres, testes de fertilização foram realizados com o objetivo de avaliar a capacidade do espermatozoide em penetrar a zona pelúcida em ovócitos de gatas domésticas (Andrews et al., 1992) ou ainda, em ovócitos de hamster (Morato & Barnabe, 1998). Para que a fertilização ocorra é necessário a ligação entre o ovócito e o espermatozoide, que envolve o reconhecimento dos receptores na zona pelúcida do ovócito e as proteínas de ligação na superfície do espermatozoide (Sinowatz et al., 2003; Rath et al., 2005). Neste sentido testes de ligação entre gametas, homólogos e heterólogos, são de grande importância na qualificação seminal uma vez que ao se quantificar a capacidade ligante pode-se inferir a capacidade fertilizante *in vitro* (Cardoso et al., 2005; Garay, 2012). Estes testes possuem como vantagem, em relação à fertilização *in vitro*, a menor demanda de tempo, uma vez que não requer a maturação ovocitária (Hewitt & England, 1997). Os ovários de animais domésticos são de fácil obtenção e permitem a criopreservação por técnicas simples, permitindo estoque de ovócitos sem perda na taxa de interação com espermatozoides *in vitro* (Gheller et al., 2009).

No presente experimento, tanto o sêmen a fresco quanto o descongelado de jaguatiricas foram capazes de se ligar ao ovócito de gatas domésticas (Fig. 3) Porém, com o uso de espermatozoides mortos por choque térmico, não foram observadas ligações consideráveis em ambos os tratamentos.

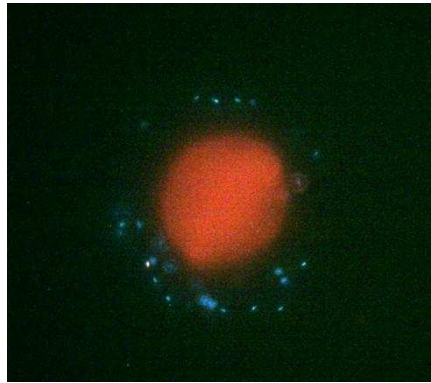


Figura 3: Espermatozoides de jaguatiricas, corados em azul com H342, ligados à zona pelúcida de ovócitos desnudos, corados de vermelho pelo iodeto de propídio, de gata doméstica (Aumento 400x).

Houve uma redução ( $p < 0,05$ ) na quantidade de espermatozoides ligados entre o tratamento descongelado em relação ao sêmen a fresco (Tab. 2). Esta redução, no entanto, não foi observada por Donoghue et al. (1992), para sêmen de tigre (*Panthera tigris*) e por Santos (2010) em sêmen de caprino, porém, foi registrado em sêmen de gato-do-mato-pequeno por Garay (2012). No presente estudo houve correlação positiva da quantidade de espermatozoides do sêmen a fresco ligados na zona pelúcida de ovócitos, com o vigor e motilidade espermáticos do sêmen descongelado ( $r = 0,8$  e  $r = 0,8$  ( $p < 0,05$ )), sendo este teste interessante na predição da congelabilidade do sêmen.

Embora tenha funcionado de forma satisfatória, existem inúmeras variáveis que afetam esses 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 (Baudi, 2005). Uma alternativa para contornar estas variáveis é o uso de hemizonas, com metades idênticas de zonas pelúcidas, e que é ideal para comparar indivíduos ou tratamentos diferentes (Baudi, 2005). Entre outros ensaios em teste, está a ligação espermática em membrana perivitelínica de ovo de galinha (Barbato, 1998; Santos, 2009; Csermak Jr, 2011; Garay 2012).

Os espermatozoides de jaguatirica foram capazes de se ligar à membrana perivitelínica de ovo de galinha em ambos os tratamentos (fresco e descongelado) (Fig. 4). Não foi observado diferença na quantidade de espermatozoides ligados no tratamento descongelado em relação ao a fresco (Tab. 2), mas houve correlação positiva ( $r= 0,91$ ;  $p<0,05$ ) entre os tratamentos a fresco e descongelado. De forma semelhante, Santos (2010) e Csermak Jr. (2011) não observaram diferença ( $P>0,05$ ) entre as médias do teste de ligação com sêmen fresco e descongelado. Em contraste, Barbato et al. (1998) em trabalho com sêmen de galo, observaram diminuição do percentual de espermatozoides ligados e atribuíram esta queda aos danos celulares causados pelo processo de congelamento. Foi observada correlação negativa entre a taxa de espermatozoides ligados na membrana perivitelínica no sêmen a fresco e no descongelado com cauda dobrada no sêmen descongelado ( $r= -0,81$ ;  $p<0,05$  e  $r= -0,86$ ;  $p<0,05$ , respectivamente). Observou-se também correlação negativa ( $r= -0,71$ ;  $p< 0,05$ ) entre a população de espermatozoides com cauda fortemente dobrada e a quantidade de espermatozoides ligados na membrana perivitelínica de ovo de galinha, ambos no sêmen descongelado, corroborando com Blom (1973), que define a cauda fortemente dobrada como um defeito maior.



Figura 4: Espermatozoides de jaguatirica, corados com Hoechst 33342 (azul) e Iodeto de propídeo (vermelho) ligados a membrana perivitelínica de ovo de galinha (Aumento 400x).

Apesar dos espermatozoides de jaguatirica terem se ligado de forma satisfatória à membrana perivitelínica de galinha, o reduzido número de amostras avaliadas provocou falhas em demonstrar a fertilidade do espermatozoide, visto que tal dado não se correlacionou com os demais parâmetros seminais avaliados e não houve diferença entre o sêmen a fresco e o descongelado (Tab. 2). No entanto, a metodologia usada no presente trabalho difere em relação à desenvolvida por Barbato et al. (1998), uma vez que foi introduzido um mecanismo suporte para a manutenção do estiramento da membrana durante o processamento, com a definição de uma área de avaliação. Sendo assim, estudos futuros, com uma maior amostragem, são necessários para a efetiva validação desta técnica.

#### 4.4. Conclusões

A avaliação espermática com a combinação das sondas fluorescentes iodeto de propídio, Hoechst 33342 e FITC -PSA foi condizente com os resultados obtidos com os testes de rotina (vigor, motilidade espermática e HOST), frente a amostras de sêmen de diferentes qualidades, com a vantagem de demonstrar de forma mais específica a localização das lesões celulares. Sendo assim esta combinação de coloração foi considerada satisfatória na qualificação do sêmen de jaguatiricas. Houve, no entanto, dificuldade em se identificar a população corada com a sonda FITC-PSA, dado o reduzido tamanho do acrossoma desta espécie.

O uso de ovócitos criopreservados de gatas domésticas mostrou-se eficiente na quantificação da capacidade ligante de sêmen de jaguatirica em amostras de diferentes qualidades. Sendo, desta forma, um teste complementar importante na predição da capacidade fertilizante.

Espermatozoides de jaguatiricas foram capazes de se ligar a membrana perivitelínica de ovo de galinha. O mecanismo suporte desenvolvido permitiu a manutenção do estiramento da membrana durante o processamento, com a definição de uma área de avaliação. Apesar de não haver diferença na ligação entre os tratamentos, a fresco e descongelado, houve correlação positiva entre eles, demonstrando que estudos

futuros, com uma maior amostragem, são necessários para a efetiva validação desta técnica.

#### 4.5. Referências bibliográficas

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. *Mol. Reprod. Dev.*, v.31, p.200-201, 1992.

ÁVILA, E. C. *Avaliação andrológica e criopreservação do sêmen de jaguatirica (*Leopardus pardalis*, LINNAEUS, 1758)*. 2009. 78f. Dissertação (Mestrado em medicina veterinária), Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

BARBATO, G.F.; CRAMER, P.G.; HAMMERSTEDT, R.H. A Practical In Vitro Sperm-Egg binding assay that detects subfertile males. *Biol. Reprod.*, v.58, p.686-699, 1998.

BAUDI, D.L.K. *Efeito de dois métodos de resfriamento sobre a função espermática in vitro de sêmen criopreservado de felinos (*Leopardus tigrinus*, *Leopardus pardalis* e *Felis catus*)*, avaliada através de ensaio competitivo de ligação em ovócitos de gata doméstica (*Felis catus*). 2005. 76f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)- Setor de Ciências agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and proposal for a new classification of the bull spermogram. *Nord. Veterinaermed.*, v.25, p.383 – 391, 1973.

BUENO, R., COSTA, E. P., GUIMARÃES, J. D., VALENTIM, F. M. Qualidade espermática do sêmen criopreservado de cães. – Efeito do meio diluidor. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, v.53, n.3, p. 364-371, 2001.

CARDOSO, R.C S.; SILVA, A.R.; SILVA, L.D.M. da. Métodos de avaliação do sêmen canino congelado. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.29, n.3/4, p.179-187, 2005.

CELEGHINI, E.C.C. *Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes*. 2005, 186f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Pirassununga.

CHECK, J.H.; STUMPO, L.; LURIE, D.; BENFER, K.; CALLAN, C.A Comparative Prospective Study Using Matched Samples to Determine The Influence of Subnormal Hypoosmotic Test Cores of Spermatozoa on Subsequent Fertilization and Pregnancy Rates Following In Vitro Fertilization. *Hum. Reprod.*, v.10, p.1197 – 1200, 1995.

CITES - CONVENTION ON INTERNATIONAL TRADE IN ENDANGERED SPECIES OF WILD FAUNA AND FLORA. *CITES Species Databases*. 2012. Disponível em: <<http://www.cites.org/eng/resources/species.html>>. Acessado em: 03 jan. 2012.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL - CBRA. *Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal* (2nd Ed.), Belo Horizonte, Brasil: Author, 1998.

COSTA, E.P. *Aspectos morfológicos (citológicos e ultraestruturais) e desenvolvimento de ovócitos bovinos in vitro*. 1994. 155f. Tese (Doutorado em

Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

COSTA, E.P.; VALE FILHO, V.R.; NOGUEIRA, J.C. ; SA, W.F. ; COSTA, A.H.A. Técnica simplificada para o desnudamento rápido de ovócitos de bovinos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, v.49, n.4, p. 425-432, 1997.

CSERMAK Jr., A.C. *Uso de sondas fluorescentes e do ensaio de ligação do espermatozóide do cão Canis (lupus familiaris) à membrana perivitelina do ovo de galinha (Gallus gallus) como método para predição da capacidade fertilizante do sêmen.* 2011. 72 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária)- Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

DONOGHUE, A. M., HOWARD, J. G., BYERS, A. P., GOODROWE, K. L., BUSH, M., BLUMER, E., et al. Correlation of Sperm Viability with Gamete Interaction and Fertilization In Vitro in the Cheetah (*Acinonyx Jubatus*). *Biol. Reprod.*, v.46, p.1047 – 1056, 1992.

GARAY, R.M. 2012. Uso de sondas fluorescente e ensaio de ligação a ovócitos heterólogos e a membrana perivitelínica de ovo de galinha (*Gallus gallus*) para a avaliação de espermatozoides frescos e descongelados de gato do mato pequeno (*Leopardus tigrinus*) 71f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)- Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

GUELLER, S.M.M.; CORCINI, C.D.; BRIZOLARA, R.M.R.; SILVA, B.E.; DANIELI, V.M.; SANTOS, E.C.S.; VARELA JÚNIOR, A.S.; VIEIRA, A.D.; BONGALHARDO, D.C.; LUCIA, T.J. Influência da forma de preservação de ovário e oócito no teste de penetração espermática in vitro. In: XVIII Congresso de Iniciação

Científica da UFPel, 2009, Pelotas, RS. Anais do XVIII Congresso de Iniciação Científica da UFPel. Pelotas, RS, 2009.

HEWITT, D.A.; ENGLAND, G.C.W. The canine oocyte penetration assay: its use as an indicator of dog spermatozoal performance in vitro. *Anim. Reprod. Sci.*, v.50, p.123–39. 1997.

HOLST, B.S.; LARSSON, B.; LINDE-FORSBERG. C.; RODRIGUEZ MARTINEZ. H. Sperm binding capacity and ultrastructure of the zona pellucida of stored canine oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, v.119, p.77-83, 2000.

HOWARD, J.G. Semen collection and analysis in nondomestic carnivores. In: FOWLER, M.E. *Zoo and wild animal medicine*. Philadelphia: W.B. Saunders Co. 1993. p.390-399.

HOWARD, J.G.; BUSH, M.; WILDT, D.E. Teratospermia in Domestic Cats Compromises Penetration of Zona-Free Hamster Ova and Cat Zonae Pellucidae. *J. Androl.*, v.12, n.1, p.36 – 45, 1991.

IUCN. *IUCN Red List of Threatened Species*. Version 2011.2. 2011. Disponível em: <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Acessado em: 06 Mar.2012.

JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. *Theriogenology*, v.60, p.743-758, 2003.

KATSOFF, D.; CHECK, M. L.; CHECK, J. H. Evidence that Sperm with low hypoosmotic swelling scores cause embryo implantation defects. *Arch. Androl.*, v.44, n.3, p.227 – 230, 2000.

LANGLAIS, J.; ROBERTS, K.D. A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Gamete Res.*, v.12, p.183–224, 1985.

LIN, Y.; KAN, F.W.K. Regionalization and redistribution of membrane phospholipids and cholesterol in mouse spermatozoa during in vitro capacitation. *Biol. Reprod.*, v.55, p.1133–1146, 1996.

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

MACHADO, A.B.M.; DRUMMOND, G.M.; MARTINS, C. S. *Lista da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Incluindo as Espécies Quase Ameaçadas e Deficientes em Dados*. Fundação Biodiversitas, Belo Horizonte, Brasil. 2005.

MELO, M.I.V.; HENRY, M. Teste hiposmótico na avaliação do sêmen eqüino. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, v.51, n.1, p. 71-78, 1999.

MORAIS, R.N.; MUCCILOLO, R.G.; GOMES, M.L.F.; LACERDA, O.; MORAES, W.; MOREIRA, N.; et al. Seasonal Analysis of Semen Characteristics, Serum Testosterone and Fecal Androgens in the Ocelot (*Leopardus pardalis*), Margay (*L. wiedii*) and tigrina (*L. tigrinus*). *Theriogenology*, v.57, n.8, p.2027 – 2041, 2002.

MORATO, R.G.; BARNABE, R.C. Biotécnicas de reprodução aplicadas à preservação de felídeos selvagens. *Clínic. Vet.*, v. 12, p. 24-26, 1998.

NEUBAUER, K.; JEWGENOW, K.; BLOTTNER, S.; WILDT, D.E.; PUKAZHENTHI, B. S. Quantity Rather Than Quality in Teratospermic Males: A

Histomorphometric and Flow Cytometric Evaluation of Spermatogenesis in the Domestic Cat (*Felis catus*). *Biol. Reprod.*, v.71, p.1517–1524, 2004.

O'BRIEN, S.J.; MARTENSON, J. S.; PACKER, C.; HERBST, L.; DE VOS, V.; JOSLIN, P.; et al. Biochemical Genetic Variation in Zoo Geographic Isolates of African and Asiatic Lions. *National Geographic Res*, v.3, p.114 – 124, 1987.

OETTLÉ, E.E. Sperm Morphology and Fertility in the Dog. *J. Reprod. Fertil.*, v.47, p.257 – 260 (Suppl.), 1993.

OLIVEIRA, T.G. & CASSARO, K. *Guia de campo dos felinos do Brasil*. Instituto Pró-Carnívoros/Fundação Parque Zoológico de São Paulo/Sociedade de Zoológicos do Brasil/Pró-Vida Brasil, São Paulo, Brasil. 2005.

PEÑA-MARTÍNEZ, A.I. Canine Fresh and Cryopreserved Sêmen Evaluation. *Anim. Reprod. Sci.*, v.82 – 83, p.209 – 224, 2004.

PINEDA, M.H.; DOOLEY, M.P.; MARTIN, P.A. Long-Term Study on the Effects of electroejaculation on seminal characteristics of the domestic cat. *Am J Vet Res*, v.45, n.5, p.1038 – 41, 1984.

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

QUEIROZ, V. S. *Estudo do efeito das condições de manipulação do sêmen de jaguatiricas (*Leopardus pardalis* Linnaeus, 1758) sobre a capacitação e a integridade morfológica e funcional dos espermatozoides*. 2003. 132 f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

RATH, D.; TÖPFER-PETERSEN, E.; MICHELMANN, H.W.; 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*, v.63, p. 352–362, 2005.

SAEG Sistema para Análises Estatísticas, Versão 9.1: Fundação Arthur Bernardes - UFV - Viçosa, 2007.

SANTOS, M.C.R. *Avaliação de métodos alternativos para análises da capacidade de ligação do espermatozóide caprino e estudo do polimorfismo no gene Izumo em caprino, devido à ação do congelamento do sêmen*. 2010. 54f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)- Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

SILVA, P.F.N.; GADELLA BM. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*, v.65, p.958-978, 2006.

SINOWATZ, F.; WESSA, E.; NEUMÜLLER, C.; PALMA, G. On the species specificity of sperm binding and sperm penetration of the zona pellucida. *Reprod. Dom. Anim.*, v. 38, p. 141-146, 2003.

TEBET, M.J. Efeito da criopreservação sobre a célula espermática em três espécies de felinos: o gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), a jaguatirica (*Leopardus pardalis*) e o gato doméstico (*Felis catus*). 2004. 145f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu.

THOMASSEN, R.; SANSON, G.; KROGENAES, A.; FOUIGNER, J.A.; ANDERSEN BERG, K.; et al. Artificial Insemination with Frozen Semen in Dogs: a

Retrospective Study of 10 Years Using a Non-Surgical Approach. *Theriogenology*, v.66, n.6-7, p.1645 – 1650, 2006.

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

WATSON, P.F. The Causes of Reduced Fertility with Cryopreserved Semen. *Anim. Reprod. Sci.*, v.60-61, p.481 – 492, 2000.

WILDT, D. E.; BUSH M.; HOWARD J. G.; O'BRIEN S. J.; MELTZER D.; VAN DYK A.; et al. Unique Seminal Quality in the South African Cheetah and a Comparative Evaluation in the Domestic Cat. *Biol. Reprod.*, v.29, p.1019 – 1025, 1983.

WILDT, D.E.; BUSH, M.; GOODROWE, K.L.; PACKER, C.; PUSEY, A.E.; BROWN, J.L.; et al. Reproductive and Genetic Consequences of Fouding Isolated Lion Populations. *Nature*, v.329, n.6137, p.328 – 331, 1987.

WILDT, D.E.; DONOGHUE, A.M.; JOHNSTON, L.A.; SCHMIDT, P.M.; HOWARD, J.G. Species and Genetic Effects on the Utility of Biotechnology for Conservation. *Symposia of the Zoological Society of London*, 1992. 64, 45 – 61.

## 5. ANEXOS

### 5.1. Anexo I: Composição dos meios utilizados

#### *TCM-199*

Modificado (COSTA, 1997)

<b>Componente</b>	<b>Quantidade</b>
TCM-HEPES	2,0 mL
NaHCO <sub>3</sub>	2,0 mL
BSA	800 µL
Lactato de Cálcio	500 µL
Piruvato	500 µL
PEN-Estrepto	200 µL
H <sub>2</sub> O tridestilada (não qsp)	14 mL

#### *Talp-Hepes*

BAVISTER et al., (1983), modificado por COSTA, 1995

<b>Componentes</b>	<b>mM</b>	<b>Quantidade</b>
NaCl	114,0	1,6655 g
KCl	3,2	0,0596 g
NaHCO <sub>3</sub>	2,0	0,0420 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	0,0120 g
Lactato de Sódio (60%)	10,0	0,219 mL
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> (glicose)	5,0	0,2252 g
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	2,0	0,0735 g
MgCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O a 50% (ESTÉRIL)	0,5	51 µL
HEPES	10,0	0,5957 g
Vermelho Fenol	-	0,0025 g
Pelicilina G sódica (1.659 UI/0,001g)	-	0,0150 g (25.000 UI)
H <sub>2</sub> O tridestilada (qsp)	-	250 mL

## 5.2. Anexo II: Diluições dos Fluoróforos para Preparo das Soluções Estoque e de Trabalho das Sondas Fluorescentes

Fonte: CELEGHINI, 2005

### **Iodeto de Propídio**

#### Solução estoque

25 mg de PI + 1 mL de DMSO (25 mg/mL)

#### Solução Trabalho (0,5 mg/mL)

20  $\mu$ L da solução estoque de PI (25 mg/mL) + 980  $\mu$ L de DPBS

#### Solução trabalho (2 mg/mL)

80  $\mu$ L da solução estoque de PI (25 mg/mL) + 920  $\mu$ L de DPBS

Armazenar em freezer, no escuro.

### **Hoescht 33342**

#### Solução estoque

100 mg H342 + 4 mL de DMSO (25 mg/mL)

#### Solução trabalho

1,6  $\mu$ L da solução estoque (25 mg/mL) + 998,4  $\mu$ L de DPBS (40  $\mu$ g/mL)

Armazenar a  $-20^{\circ}\text{C}$  no escuro

### **FITC-PSA**

#### Solução trabalho (100 $\mu$ g/mL)

2 mg de FIT-PSA + 20 mL de DPBS +10% de solução de azida de sódio 10%

Aliquotar e armazenar a  $4^{\circ}\text{C}$ , no escuro.