

EDUARDO COSTA ÁVILA

**AVALIAÇÃO ANDROLÓGICA E CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE
JAGUATIRICA (*Leopardus pardalis* Linnaeus 1758)**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2009**

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

T

A958a
2009

Ávila, Eduardo Costa, 1980-

Avaliação andrológica e criopreservação do sêmen de jaguatirica (*Leopardus pardalis* Linnaeus, 1758) / Eduardo Costa Ávila. – Viçosa, MG, 2009.

xi, 65f.: il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Tarcizio Antônio Rêgo de Paula.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. *Leopardus pardalis* - Sêmen. 2. *Leopardus pardalis* - Ejaculação. 3. Sêmen - Criopreservação. 4. Espermatogênese em animais. I. Universidade Federal de Viçosa.
II. Título.

CDD 22.ed. 599.755

EDUARDO COSTA ÁVILA

**AVALIAÇÃO ANDROLÓGICA E CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN DE
JAGUATIRICAS (*Leopardus pardalis* Linnaeus, 1758)**

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

APROVADA: 03 de março de 2009.


Prof. José Domingos Guimarães


Prof. Deiler Sampaio Costa


Prof. Antonio Bento Mancio


Prof. Sérgio Luís Pinto da Matta


Prof. Tarcízio Antônio Rêgo de Paula
(Orientador)

“A humanidade é infeliz por ter feito do trabalho um sacrifício e do amor um pecado”

José Saramago

A

Láís Corrêa de Araújo (*in memoriam*) que, apesar de todo carinho, ensinamento, ajuda e colaboração, não pôde estar presente neste importante momento.

AGRADECIMENTOS

A todos os meus familiares, em especial meus pais e meus avós por todo apoio e carinho em todas as jornadas conquistadas.

À Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade em cursar no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária.

Ao meu orientador Tarcízio Antônio Rêgo de Paula pela confiança, aprendizado, amizade e aconselhamentos.

Ao carinho e solicitude de Regina, Rebeca e Tarcizinho.

À minha querida namorada Thais, por todo o amor, apoio, carinho e compreensão nos momentos fáceis e difíceis.

Aos meus novos parentes Patrícia, Vicente, Paula, Andréia, Bruno, Aninha, Beto, Sara, Roberta e Diego, que me receberam com carinho em suas famílias.

Aos funcionários do Departamento de Veterinária, Rosi, Isabel, Luciano, Geraldinho, Margarete, Maninha, Camilinho, Heloísa e Paulo por toda ajuda, apoio e amizade.

A Myrian Ávila, Rodrigo Duarte e Sérgio Luz pelas revisões, correções e formatação da dissertação.

A todos os professores e participantes da banca de defesa, pelo carinho e ajuda cedida à dissertação.

Ao CETAS-UFV, que em sete anos me proporcionou experiências profissionais e pessoais que favoreceram a minha formação.

Aos profissionais e companheiros do CETAS-UFV Alexandre, Ana Carolina, Antonio Carlos, Gediendson, Graziella, Juliano, Marcos, Moacir, Pâmella, Thais e Thyara por todo trabalho em conjunto, e coleguismo durante a resolução dos problemas.

A Thyara, Gê e Marcos (juntos formando o Quarteto Fantástico), pela confiança, companheirismo e amizade eterna.

A todos os estagiários do CETAS-UFV, em especial Leticia, Ingrid, Carla, Rosi, Ayisa, Marcelo, Vinícius, Leanes, Rafael, César, Fernandinha, Pablo, Baiano, Junia, Kíssia e Guilherme por todo esforço e vontade de aprender e crescer academicamente.

À Diretoria de Reabilitação e Destinação de Animais Silvestres, que durante dois anos de muito esforço e dedicação, trabalhou em prol dos animais cativos e em vida livre.

A José Antônio pelo companheirismo, aconselhamentos e toda ajuda em manter o CETAS em funcionamento.

A Leonardo Maciel, por autorizar o uso dos animais para o experimento.

A Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte, por autorizar o uso dos animais para o experimento.

Aos Médicos Veterinários e estudantes, Thais, Thyara, Rebeca, Juliano, Moacir, Simone e Gediendson por toda ajuda nas coletas realizadas.

Aos professores do Departamento de Veterinária, Cláudio Fonseca, Marco Túlio (*in memorian*), José Antônio Viana, Marlene Vargas, Joaquim Patarroyo, Eduardo Paulino e Jackson Araújo pelas dicas e ajuda durante a graduação e o mestrado.

Aos colegas de república Vitor, Márcio Negão, Bruno Edésio, Diego, Cristielly e Bárbara pelo companheirismo em casa.

Aos colegas veterinários e amigos Abelardo, Kelly, Tatiana, Maria Fernanda, Giancarlo, Betânia, Lukia, Evandro e Guilherme Peixoto por toda ajuda e disponibilidade quando necessárias.

Aos grandes amigos Thyara, Gê, Marcos, Leticia, Moacir, Vitor, Tavela, Carlão, Abelardo, Kelly, Tatinha, Kiki, Ingrid, Carla, Matteo, Harvey, Diego, Bruno Edésio e Márcio Negão por todo o carinho e amizade.

Aos amigos distantes Viviane Junqueira, Andréa Coutinho, Juliana Munique, Raul Fonseca, Atsuka Minami, Gabriel Braga, Érico Franco, Guilherme Siqueira, Christiano Silva, Luciene Lignani, Paloma Arregy, José Francisco Massoneto, Leonardo Toshio, Fabiana Lana, Daniela Castro, Daniel (Araketu), Mirelle Bernardi, Fernanda Staino, Patrícia Macelan, Paulo Ricardo Bersano, Róberson Sakabe, Luana Assis, Isabella Lopes, Jamille Daer, Anamaria Carvalhães, Marina Nery, Gabriela Micoli, Daniel Vilela, Jânio Câmara, Teresinha Câmara, Vanessa Câmara, Mônica Câmara, Manuel de Moura, Maria Olímpia, Larissa Abadjieff e Marcelle Zaninni agradecendo o apoio carinho e amizade de todos vocês.

BIOGRAFIA

EDUARDO COSTA ÁVILA, filho de Paulo Corrêa de Araújo Ávila e Margareth Costa Ávila nasceu em Belo Horizonte, no dia 06 de Fevereiro de 1980. Coursou Ensino Fundamental no Colégio Pitágoras, Colégio Regina Pacis e Escola Municipal Salgado Filho em Belo Horizonte. Coursou o ensino médio no Colégio Santa Tereza D'Ávila em Belo Horizonte.

No ano de 1999 ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (UFV), concluindo em Janeiro de 2004 Nesse mesmo ano, participou da Equipe de Resgate de Fauna da Usina Hidrelétrica de Irapé – MG durante a fase de desmatamento da área da represa.

Durante o ano de 2005 clinicou na Sociedade Mineira Protetora dos Animais em Belo Horizonte e na Clínica Veterinária Vida Animal em Cosmópolis-SP.

Em 2006 participou da Equipe de Resgate de Fauna da Usina Hidrelétrica de Irapé – MG durante a fase de enchimento da represa.

Em março de 2007 ingressou no Programa de Pós-Graduação do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa – UFV, área de concentração em reprodução animal, concluindo os requisitos necessários à obtenção do título de “Magister Scientiae” em fevereiro de 2009.

É autor dos livros de poesias “Algo a dizer” publicado na Primavera de 1999, premiado pela Academia Mineira de Letras em 2003, e “Do meu jeito” publicado na Primavera de 2008.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	04
2.1 JAGUATIRICA (<i>Leopardus pardalis</i> Linnaeus, 1758)	04
2.2 PROTOCOLOS ANESTÉSICOS	06
2.3 ESPERMATOGÊNESE DE JAGUATIRICAS	07
2.4 COLETA DE SÊMEN	08
2.5 AVALIAÇÃO DO SÊMEN	09
2.6 CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN	13
2.7 AVALIAÇÃO DO SÊMEN PÓS-DESCONGELAMENTO	16
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
4. ARTIGO I: PROTOCOLOS DE COLETA DE SÊMEN POR ELETROEJACULAÇÃO EM JAGUATIRICAS (<i>Leopardus pardalis</i> Linnaeus, 1758)	27
RESUMO	27
ABSTRACT	28
1. INTRODUÇÃO	29
2. MATERIAL E MÉTODOS	30
3. RESULTADOS	35
4. DISCUSSÃO	37
5. CONCLUSÃO	39
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
5. ARTIGO II: CARACTERÍSTICAS SEMINAIS E CONGELABILIDADE DE SÊMEN DE JAGUATIRICA (<i>Leopardus pardalis</i> Linnaeus, 1758) ADULTAS, MANTIDAS EM CATIVEIRO, UTILIZANDO DOIS CRIOPROTETORES	43
RESUMO	43
ABSTRACT	45
1. INTRODUÇÃO	46
2. MATERIAL E MÉTODOS	49
3. RESULTADOS	53
4. DISCUSSÃO	56
5. CONCLUSÃO	58
6. BIBLIOGRAFIA	59
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	65

RESUMO

ÁVILA, Eduardo Costa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2009. **Avaliação andrológica e criopreservação de sêmen de jaguatirica (*Leopardus pardalis* Linnaeus, 1758)** Orientador: Tarcízio Antônio Rêgo de Paula. Co-orientadores: Eduardo Paulino da Costa e Cláudio César Fonseca.

Este trabalho apresentou três experimentos realizados em jaguatiricas adultas de cativeiro. O primeiro experimento teve por objetivo principal o estudo comparativo entre dois protocolos para coleta de sêmen por eletroejaculação. Foram comparadas a técnica convencionalmente utilizada na literatura para felídeos (80 estímulos elétricos em 3 séries de 2 a 6V) e uma adaptação na qual se preconiza o esvaziamento e lavagem da bexiga, para se evitar a contaminação do sêmen pela urina, e utiliza um menor número de estímulos elétricos idênticos, porém com uma voltagem mais alta (35 estímulos elétricos em sete séries de cinco estímulos de 16V). Foi utilizado um total de seis animais sendo que em quatro foram realizadas ambos os protocolos. Foram realizadas três coletas de sêmen para cada técnica em cada animal. Foram aferidos o peso, a biometria corporal e testicular e as características do sêmen avaliadas foram: aspecto, volume espermático, motilidade espermática, vigor, concentração espermática, total de espermatozóides por ejaculado e índice espermático. Ambos os protocolos mostraram eficiência para a coleta de amostras de sêmen, porém, com o protocolo modificado, obteve-se em média valor 6 vezes maior para volume espermático (1,2 mL), cerca de 3,6 vezes maior de concentração espermática por mililitro de sêmen ($456,6 \times 10^6$), e dezoito vezes maior de número total de espermatozóides por ejaculado ($667,3 \times 10^6$). O protocolo modificado se mostrou ainda mais rápido e livre de contaminação por urina. Os dados qualitativos dos espermatozóides como vigor, motilidade e índice espermático demonstraram ótima qualidade espermática e foram compatíveis com os dados

fornechos pela literatura. O segundo experimento apresentou um estudo da caracterização do ejaculado de seis jaguatiricas. A coleta do sêmen foi feita por eletroejaculação (80 estímulos elétricos em 3 séries de 2 a 6V) realizada com o esvaziamento e lavagem prévios da bexiga, para se evitar a contaminação do sêmen pela urina. Foram realizadas três coletas de cada animal. Os resultados da caracterização do ejaculado revelaram parâmetros semelhantes aos dados da literatura, destacando-se os valores médios de espermatozóide totais por ejaculado (37,1 milhões), índice espermático (83%), número total de patologias (35,9%) e patologias primárias e secundárias (8,9%) e (27,7%), respectivamente. O terceiro experimento, realizado em duas jaguatiricas, avaliou os meios crioprotetores à base de glicerol e etileno glicol, ambos a uma concentração de 6%, na viabilidade do sêmen pós descongelamento de dois animais. Para isso, foram realizados testes de Termorresistência (TTR), Hiposmótico (HO) e Coloração Supravital (CS). No presente estudo, o meio a base de glicerol se apresentou melhor no teste TTR (45 a 60min glicerol e 35 a 40min etileno glicol), e os testes HO e SC tiveram uma percentagem de 34% a 43% de células com integridade de membrana e entre 20% e 68% de células viáveis no pós-descongelamento em ambos os protocolos testados.

ABSTRACT

ÁVILA, Eduardo Costa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, march of 2009. **Andrologic evaluation and semen cryopreservation in ocelot (*Leopardus pardali* Linnaeus, 1758).** Adviser: Tarcízio Antônio Rêgo de Paula. Co-advisers: Eduardo Paulino da Costa e Cláudio César Fonseca.

This study presented three experiments realized in six adult captive ocelots. The first experiment had as a main objective, the comparative study of a two protocols for semen collection by electroejaculation. Were compared the conventional technique applied in felids recommended by the scientific literature (80 electric stimuli in 3 series from 2 to 6v), and an adaptation of the conventional technique that praise de emptying and washing of the bladder to avoid semen contamination by urine, and uses a minor number of identical electric stimulus, however with a higher voltage. (35 electric stimuli in 7 series of 5 stimuli of 16v). A total of six animals were used, and in four of them were tested the two protocols. Three semen collections were made in each technique for each animal. The weight, corporal and testicular measurements were realized, and the semen characteristics evaluated were the aspect, sperm volume, sperm motility, sperm progressive status, sperm concentration, total sperm of ejaculate, and sperm motility index. Both protocols showed efficiency, but the modified protocol, got values on average 6 times bigger for sperm volume (1,2 mL), about 3,6 times bigger of sperm concentration for milliliter of semen ($456,6 \times 10^6$), and 18 times bigger of total number of sperm per ejaculate ($667,3 \times 10^6$). The modified protocol showed fast free and of contamination for urine. The qualitative data of the spermatozoa as sperm progressive status, sperm motility and sperm motility index had demonstrated excellent sperm quality and had been compatible with the data supplied for literature. The second experiment presented a study of the characterization of the ejaculate of six adult ocelots of captivity and a

comparative assay between two cryoprotectors in the freezeability of the semen in two of these animals. The collections of the semen was made by electroejaculation (80 electric stimuli in 3 series of 2 to 6v) carried through with the previous emptying and washing of the bladder, to prevent the contamination of the semen for urine. Three collections of each animal had been carried through. The characterization of the ejaculate one was based evaluation of the semen's color, consistency, gradual sperm motility, to the sperm progressive status, the sperm concentration, the total of sperm for ejaculate, the sperm index and of the morphologic analysis of the semen. The surveyed parameters had been all fellow creatures to the data of literature, being distinguished total the average values of ejaculate spermatozoon for (37,1 million), sperm index (83%), total number of pathology (35.9%) and primary (8.9%) and secondary pathology (27.7%). The third experiment evaluated two extensor cryoprotectors with the base of glycerol and ethylene glycol, both to a 6% concentration, in the viability of the semen after unfreeze of two animals. For this, tests of Thermoresistance (TTR), Hiposmotic (HO) and Supravital Coloration (CS). had been carried through In the present study, the media with the base of glycerol presented best results in the TTR test (45 to 60min glycerol and 35 to 40min ethylene glycol), and tests HO and SC had had a percentage of 34% to 43% of cells with integrity of membrane and between 20% and 68% of viable cells in the after-unfreeze in both of the tested protocols.

1. INTRODUÇÃO

A crescente degradação ambiental provocada pelos desmatamentos, construções de barragens, acidentes como derramamento de produtos químicos e queimadas têm como consequência direta a redução e a fragmentação dos inúmeros ecossistemas, levando uma grande diversidade de espécies a sofrer rápido declínio em seu número com consequente perda da diversidade genética (Guimarães, 2002). Os felinos silvestres estão entre as espécies mais ameaçadas do mundo, sendo afetados por fatores que variam geograficamente, seja pela descaracterização de habitats, exigências alimentares, forte pressão de caça (em função do alegado prejuízo que causam ao predarem criações domésticas), além da baixa densidade natural (International Union for Nature Conservation [IUCN], 1996).

A família Felidae é um dos grupos com maior diversidade dentre os carnívoros e inclui espécies que variam em tamanho desde 1 kg até mais de 230 kg (Emmons, 1988). Os felinos são exclusivamente carnívoros e representam os maiores predadores das florestas tropicais. São tidos, portanto, como “espécie-chave”, influenciando diretamente nas populações de suas presas e indiretamente nas populações animais e vegetais relacionadas a estas (Miller & Rabinowitz, 2002).

Segundo Cubas, Z. S., Silva, J. C. R. & Catão-Dias, J. L. (2006), no Brasil ocorrem oito dessas espécies, entre felinos de grande, médio e pequeno porte. São elas: a onça-pintada (*Panthera onca*), a onça-parda (*Puma concolor*), a jaguatirica (*Leopardus pardalis*), o gato-maracajá (*Leopardus wiedi*), o gato-do-mato-grande (*Leopardus geoffroyi*), o gato-palheiro (*Leopardus colocolo*), o gato-mourisco (*Puma yagouaroundi*) e o gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*). De acordo com a Lista Nacional das Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção do Instituto Brasileiro do meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Instituto Brasileiro do meio Ambiente e

dos Recursos Naturais Renováveis [IBAMA], 2003), todas essas espécies apresentam algum grau de ameaça de extinção, sendo que estão classificadas pela Convenção para o Comércio Internacional de Espécies Ameaçadas da Fauna e Flora Selvagem como grau I ou II de ameaça (Convenção para o Comércio Internacional de Espécies Ameaçadas da Fauna e Flora Selvagem [CITES], 2008).

Nas décadas de 50 até 80 do século 20, a demanda de peles no mercado internacional resultou numa forte exploração das jaguatiricas. Estima-se que no fim da década de 60 o Brasil tenha exportado aproximadamente 80 mil peles para os Estados Unidos (Murray & Gardner, 1997). A espécie é considerada criticamente em perigo no Estado de Minas Gerais (Machado, A. B. M., Fonseca, G. A. B., Machado, R. B., Aguiar, L. M. & Lins, L. V., 1998), foi listada no Apêndice I (CITES, 2008), e consta na Lista Nacional das Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção (IBAMA, 2003).

Devido a isto, nos últimos dez anos a conservação destes felídeos tem sido foco da pesquisa em reprodução e de programas de treinamento voltados para as Américas, principalmente Brasil, México e U.S.A. (Swanson & Brown, 2004).

É possível atuar na conservação das espécies ameaçadas com projetos de conservação *in situ* e *ex situ*, envolvendo estratégias de conservação da população em seu ambiente natural e em cativeiro. Como estratégia *ex situ* estão as tecnologias de reprodução assistida, como criopreservação de gametas, inseminação artificial, fertilização *in vitro* e transferência de embriões que vêm sendo cada vez mais aplicadas (Wildt, D. E., Bush, M. & O'Brien, S. J., 1987; Swanson, 1998).

Tais tecnologias, em especial a coleta e criopreservação de sêmen, permitem a translocação apenas do material genético entre populações de vida livre isoladas e entre populações de vida livre e animais em cativeiro (Swanson, 1998). Para o uso efetivo destas tecnologias nas espécies de felídeos, o estudo e a propagação do conhecimento básico e de novas tecnologias são necessários, pois há variações espécie-específicas que precisam ser consideradas no desenvolvimento destes protocolos (Swanson & Brown, 2004).

Na tentativa de se utilizar das biotécnicas reprodutivas como ferramenta conservacionista, alguns resultados já foram obtidos no gênero *Leopardus*, como a coleta, avaliação, inseminação artificial com sêmen fresco e congelado na jaguatirica (Howard, 1993; Swanson et al., 1996; Morais et al., 2002; Queiroz, 2003; Swanson et al., 2003; Baudi, 2005) e no gato-do-mato-pequeno (Moraes et al., 1997), a produção de embriões por meio de fertilização *in vitro* na jaguatirica e no gato-do-mato-pequeno (Miller, A. M., Roelke, M. E., Goodrowe, K. L., Howard, J. G. & Wildt, D. E., 1990;

Swanson, 2001) e a transferência de embrião pós-congelamento na jaguatirica (Swanson, 2001).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Jaguatirica (*Leopardus pardalis* Linnaeus, 1758)

A jaguatirica 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, 1996). Mede de 50 cm a 1 m de comprimento (além da cauda, que pode medir até 45cm). Vive em torno de 20 anos em cativeiro (Wieloch, D. R., Veado, B. V. & Furtado, D. B., 1997). Também é conhecida como Ocelote (Oliveira & Cassaro, 1999). Ocorre desde o sul do Texas, México, América Central e América do Sul até o norte da Argentina (Murray & Gardner, 1997). No Brasil, está presente nos mais variados ecossistemas, de florestas úmidas até a caatinga, sendo encontrada em todas as regiões do Brasil, exceto no sul do Rio Grande do Sul (Oliveira & Cassaro, 1999; Cubas et al., 2006) (Figura 1).



Figura 1: Área de distribuição da jaguatirica (No Extinction [NEX], 2008)

A coloração da pelagem ventral é esbranquiçada, e a do dorso varia de cinza, amarelo pálido ao castanho ocráceo, com rosetas negras abertas que se fundem na região do pescoço dando um aspecto de listras. Cada indivíduo apresenta um padrão único de rosetas, que pode ser comparado a uma “impressão digital” (Oliveira & Cassaro, 1999; Jacob, 2002; Trolle & Kery, 2003; Dillon, 2005) (Figura 2).



Figura 2: Jaguatirica (*Leopardus pardalis* Linnaeus, 1758) (Discovery Travel World, 2009)

Apresenta hábitos diurnos e noturnos, e se alimenta de pequenos mamíferos, lagartos, aves e ovos (Ximenez, 1982; Bisbal, 1986; Emmons, 1987, 1988; Farrel, L. E., Roman, J. & Sunquist, M. E., 2000; Bianchi, 2001; Cubas et al., 2006). Possui hábitos solitários, onde o macho ocupa uma área de 10 a 40 km², enquanto a fêmea ocupa uma área de 0,76 a 1,3 km², sendo que um macho pode sobrepor o território de até três fêmeas, e uma fêmea raramente sobrepõe o território de outra (Crawshaw & Quigley, 1989; Mantovani, 2001).

Na jaguatirica, a puberdade está relacionada ao 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*, 2008). Estudos de hormônios esteróides reprodutivos e da atividade ovariana em fêmeas de pequenos felinos em cativeiro mostram que essas espécies não apresentavam padrão

característico de sazonalidade reprodutiva, portanto, experimentações com a reprodução desses animais podem ser conduzidas durante todo o ano (Eaton, 1984; Moreira, 2001).

Fêmeas são poliestrais contínuas e com padrão de ovulação induzida ocorrendo após estímulo da cópula (Moreira, 2001). A cópula ocorre de 5 a 10 vezes por dia, com montas que duram aproximadamente um minuto e meio, e a probabilidade de concepção é de 60% (Eaton, 1978; Mellen, 1990). O ciclo estral é de aproximadamente 25 dias e o estro dura 4,6 dias (Mellen, 1990). Eaton (1977) descreve um período de 7 a 10 dias para o estro, e um período de interestro de 6 semanas.

O período de gestação varia entre 70 e 85 dias (Mellen, 1990; Green, 1991; Cubas et al., 2006) e os machos parecem não contribuir para o cuidado dos filhotes. 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).

De acordo com a Sociedade de Zoológicos do Brasil (Sociedade de Zoológicos do Brasil [SZB], 2002) o último censo realizado com jaguatiricas (*Leopardus pardalis*) em 41 Zoológicos, demonstrou que de um total de 76 animais, três haviam nascido e oito morreram. Dessa forma conclui-se que a percentagem de mortos (10,52%) foi superior à percentagem de nascidos (3,94%).

2.2. Protocolos anestésicos

Para a realização de procedimentos de coleta de sêmen por eletroejaculação, alguns tipos de anestésicos devem ser evitados, pois relaxam a musculatura ao redor da bexiga, podendo resultar em contaminação urinária do sêmen e uma rápida perda da motilidade durante a coleta. Esses fármacos são o diazepam, derivados da fenotiazina tais como maleato de acepromazina, e anestésicos inalatórios, como o halotano e o isoflurano (Howard, 1993; Morato & Barnabé, 1998). A contaminação do sêmen obtido por eletroejaculação com urina é problemática em canídeos, ursídeos e felídeos (Howard, 1993). A atropina pode diminuir o volume total do ejaculado (Platz & Seager, 1978; Morato & Barnabé, 1998).

Morais et al. (2002) descreveram um protocolo anestésico para jaguatiricas utilizando uma associação comercial dos cloridratos de tiletamina e zolazepam (Telazol, Fort Dodge Laboratories, Inc, Fort Dodge, IA 50501) na dose de 10 mg/kg via intramuscular.

Coletas de sêmen por eletroejaculação em jaguatiricas foram realizadas por Queiroz (2003), utilizando-se como protocolo anestésico tiletamina/zolazepam (5-10 mg/kg; Zoletil 50, Virbac) e manutenção anestésica com isoflurano inalatório. O autor obteve uma taxa de 75% de contaminação por urina em pelo menos uma fração do ejaculado e em 53% dos animais foi necessária suplementação anestésica a partir da dose inicial.

Sarti (2006) obteve sucesso utilizando o protocolo anestésico com a associação entre os cloridratos de quetamina (10 mg/Kg) e xilazina (2 mg/Kg) pela via intramuscular em jaguatiricas para realizar a biópsia testicular.

2.3. Espermatogênese de jaguatiricas

Sarti (2006) utilizou cinco jaguatiricas macho adultas, as quais foram submetidas à anestesia geral, pesadas, tiveram os testículos mensurados e biopsiados para obtenção de fragmentos representativos, que processados histologicamente, e analisados em microscopia de luz. Através do cálculo volumétrico, a massa testicular média foi de 8,5 g. O índice gonadossomático encontrado foi de aproximadamente 0,12%, o índice tubulossomático de 0,074% e o índice leydigossomático de 0,0036%. Em jaguatiricas macho adultas, a albugínea testicular representou 23,42% da massa testicular. O parênquima testicular de jaguatiricas adultas apresentou 80,58% de sua massa alocada em túbulos seminíferos e 19,39% alocada em tecido intertubular, perfazendo respectivamente um volume de 10,53 e 2,58 mL. A maior parte do tecido intertubular estava alocado em tecido conjuntivo frouxamente distribuído. O diâmetro da secção transversal de túbulos seminíferos na jaguatirica adulta foi em média 211,37 μm , enquanto a espessura média do epitélio seminífero foi de 75,38 μm . A jaguatirica adulta apresentou em torno de 17,81 metros de túbulo seminífero por grama de testículo.

A célula de Leydig da jaguatirica apresentou-se uninucleada, com o núcleo arredondado contendo uma fina camada de heterocromatina ao longo do envelope nuclear e, na maioria das vezes, um único nucléolo. Observou-se, ainda, montantes variáveis de pigmentos de lipofuccina em seu citoplasma. A jaguatirica adulta apresentou cerca de 33,39 milhões de células de Leydig alocados por grama de testículo, com volume unitário de 913,39 μm^3 . Embora as jaguatiricas possuam células

de Leydig com pequeno volume unitário, o número destas células por grama de testículo é semelhante àquele dos demais felinos estudados (Sarti, 2006).

2.4. Coleta de sêmen

Coletas de sêmen em gatos domésticos podem ser realizadas com o uso de uma vagina artificial ou por eletroejaculação. Ejaculados obtidos por eletroejaculação em gatos geralmente possuem maior volume, menor concentração, menor número de espermatozoides totais, quando comparados com coletas por vagina artificial. Isto se deve à estimulação elétrica das glândulas acessórias (Axner & Linde-Forsberg, 2002). A morfologia do sêmen coletado por uma vagina artificial não difere daquele coletado por eletroejaculação (Pukazhenti, B., Wildt, D. E. & Howard, J. G., 2001). Estimulação elétrica e anestésias repetidas não afetaram a capacidade de ejaculação do gato (Pineda, M. H., Dooley, M. P. & Martin, P. A., 1984). A eletroejaculação é o método mais utilizado para obtenção de sêmen em felinos (Platz Jr., C. C., Follis, T., Demorest, N. & Seager, S., 1976).

Para a coleta do sêmen pela eletroejaculação, um estimulador elétrico e um transdutor retal são necessários e o gato deve estar anestesiado durante o procedimento. O transdutor retal possui três eletrodos longitudinais. Ele é lubrificado e inserido de 7 a 9 centímetros no reto com os eletrodos direcionados ventralmente (Platz & Seager, 1978).

A contaminação do sêmen por urina pode ocorrer devido à voltagem utilizada, quando essa excede o máximo necessário à ejaculação ou posicionamento muito cranial da probe retal. Em carnívoros, os melhores resultados foram alcançados quando probes com eletrodos longitudinais foram usadas se comparadas àquelas com eletrodos circulares (Howard, 1993).

O protocolo mais utilizado atualmente consiste em um total de 80 estímulos elétricos de 2 a 6V aplicados em três séries (30, 30 e 20 estímulos). Cada estímulo é aplicado de forma a demorar aproximadamente 1s para ir de 0V à voltagem desejada, permanecendo por 2 a 3s na voltagem desejada, seguido por um retorno abrupto a 0V, onde permanece por 2 a 3s. A primeira série consiste em 10 estímulos de 2V, 10 de 3V e, finalmente, 10 de 4V. O gato então descansa por 2 a 3min. A próxima série consiste de 10 estímulos a 3V, 10 estímulos a 4V e, finalmente, 10 a 5V e o gato novamente descansa por 2 a 3min. A última série consiste de 10 estímulos de 5V, seguidos por 10

de 6V. Para cada estímulo, o gato responde com a extensão dos membros pélvicos. Para a coleta do sêmen, o pênis do gato é exposto pela aplicação de uma suave pressão em sua base, e o sêmen é coletado em um pequeno frasco pré-aquecido, acoplado ao pênis (Wildt et al., 1983; Howard, J. G., Bush, M. & Wildt, D. E., 1986).

Experimentações direcionadas à coleta e avaliação de sêmen de felídeos silvestres brasileiros vêm sendo realizadas a fim de colaborar na tentativa de minimizar a extinção dessas espécies mesmo em cativeiro. Morais et al. (2002) utilizaram a eletroejaculação para a coleta de sêmen em jaguatirica, gato-maracajá e gato-do-mato-pequeno. O sêmen foi coletado com a ajuda de um eletroejaculador de ondas alternadas de 60 Hz e transdutor retal contendo três eletrodos posicionados longitudinalmente. Em uma seqüência regular, os estímulos elétricos foram aplicados, em três séries intercaladas (Séries 1 e 2 = 30 estímulos por série; Série 3 = 20 estímulos) em um intervalo de tempo aproximado de 10 min. Cada série consistiu de grupos repetidos de 10 estímulos aplicados em voltagens crescentes (de 2 a 6 V).

Howard (1993) demonstrou que as características do sêmen e a resposta para as várias técnicas de coleta do sêmen são espécie-específicas. Além disso, o sêmen do carnívoro é sensível à manipulação, e a manutenção da viabilidade do sêmen depende do método de processamento. Muitas espécies de felídeos produzem grandes proporções de espermatozóides de morfologia anormal, o que parece estar relacionado com a perda da variabilidade genética.

2.5. Avaliação do sêmen

A avaliação dos testículos inclui a observação da consistência dos testículos classificando-os em duros, elásticos ou flácidos. A avaliação da consistência e temperatura do epidídimo, além das condições do cordão espermático também são dados importantes. Expor o pênis do prepúcio e observar a presença ou ausência de secreções anormais bem como observar a presença ou ausência de espículas devem fazer parte do exame clínico inicial em felinos (Morais, 1999).

As amostras de sêmen devem ser avaliadas quantitativa e qualitativamente. A combinação de critérios mais amplamente usada para avaliar o sêmen de felinos inclui: aspecto, volume, pH, motilidade, vigor, concentração e morfologia espermática. (Platz et al., 1976; Howard, 1993; Wildt, D. E., Bush, M. & O'Brien, S. J., 1993; Swanson et al., 1996). O aspecto do sêmen é um critério importante, pois fornece informações sobre

alterações fisiológicas de glândulas sexuais acessórias e testículo (Mann & Lutwak-Mann, 1981).

O volume e a concentração do ejaculado são extremamente úteis para fornecer informações quanto à produção de sêmen e a determinação das diluições a serem realizadas (Salisbury, G. W., Birge, W. J., Torte, L. de la & Lodge, J. R., 1961). Vários fatores influenciam o volume do ejaculado, incluindo o grau de estimulação sexual, o número de ejaculações sucessivas de um mesmo animal, além do método utilizado para coleta do sêmen (Wildt et al., 1986). O ejaculado coletado por meio de eletroejaculação geralmente possui um volume maior, concentração mais baixa e pH mais elevado se comparado com vagina artificial (AV) ou manipulação digital. Mas isso não quer dizer que seja de qualidade inferior para criopreservação ou fertilização (Howard, 1993).

O pH caracteriza o poder tampão do ejaculado e fornece informações sobre possíveis contaminações com urina, pH ácido, e bactérias, pH básico (Platz & Seager, 1978).

A motilidade espermática é expressa em percentagem de movimento progressivo numa escala de 0% a 100%, sendo 0% para todos os espermatozóides imóveis e 100% para desempenho máximo do ejaculado com movimento progressivo (Howard, 1993)

A manutenção da motilidade do sêmen *in vitro* é influenciada por inúmeros fatores, incluindo meio de cultura, pH e temperatura. Em muitas espécies, a viabilidade do sêmen é comprometida pelos componentes do plasma seminal. Não diluído, o sêmen puro geralmente mantém a motilidade espermática *in vitro* por duas horas ou menos (Howard, 1993).

Para determinar um índice de motilidade espermática com ênfase na percentagem de motilidade e movimento progressivo foi criado o Índice de Motilidade Espermática (IME), que é calculado por: $IME = \text{Motilidade espermática (\%)} + (\text{movimento progressivo} \times 20) / 2$ (Howard, 1993).

A morfologia espermática é avaliada fixando-se uma alíquota de sêmen com glutaraldeído a 1%, posteriormente analisada em microscópio de contraste de fase com aumento de 1000 x (Howard, 1993).

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 (Howard, 1993).

A concentração espermática e o número total de espermatozóides por ejaculado variam em função de vários aspectos. Fatores ambientais podem interromper ou diminuir a produção espermática, o número de células de Sertoli que dão sustentação e modulam a maturação espermática também interferem diretamente na produção diária de espermatozóides (Kretser & Kerr, 1994). Variações no volume testicular podem alterar o número de espermatozóides no ejaculado (Sharpe, 1994).

Caracteriza-se normospermia como uma percentagem maior que 60% de espermatozóides normais presentes no ejaculado, e teratospermia como sendo uma percentagem menor que 40% de espermatozóides normais presentes no ejaculado (Pukazhenthil et al., 2001; Neubauer, K., Jewgenow, K., Blottner, S., Wildt, D. E. & Pukazhenthil, B. S., 2004).

A teratospermia frequentemente está presente em felídeos, incluindo certos gatos domésticos, mas os mecanismos celulares e moleculares que provocam este fenômeno são desconhecidos (Neubauer et al., 2004). Espermatozóides de machos teratospérmicos são mais susceptíveis aos danos provocados pelo frio e estresse osmótico, que promovem ruptura da membrana (Pukazhenthil et al., 2001).

Em animais teratospérmicos, os espermatozóides demonstraram também menor capacidade de penetrar em ovócitos livres de zona pelúcida de hamster, menor capacidade de aderir e penetrar em zona pelúcida de ovócito homólogo e menor capacidade de fertilizar um ovócito (Howard et al., 1986; Howard, 1993). Howard (1993) sugere que a reduzida habilidade em fertilizar, de espermatozóides de animais teratospérmicos, pode estar relacionada com alterações dependentes de andrógenos no epidídimo e com uma deficiência em proteínas ou receptores na superfície desta célula envolvidos com a adesão ao ovócito.

A morfologia espermática é um parâmetro de avaliação *in vitro* de fácil acesso e de grande importância uma vez que está intimamente correlacionado com casos de infertilidade (Oettle, 1993). As anormalidades morfológicas espermáticas são classificadas de acordo com a região de origem como defeitos primários (formam-se durante a espermatogênese) ou defeitos secundários (formam-se durante a maturação epididimária); e ainda de acordo com a correlação com a fertilidade como defeitos menores, não correlacionados com a fertilidade, ou defeitos maiores, aqueles relacionados negativamente com a fertilidade (Oettle & Soley, 1988).

A avaliação da morfologia espermática visa caracterizar o espermatozóide normal e classificar as formas anormais. As formas anormais do sêmen estão divididas em primárias e secundárias (Blom, 1950). O sistema de classificação da morfologia

espermática historicamente inclui as células com defeitos estruturais ocorridos durante a espermatogênese como as que apresentam defeitos primários, onde podem ocorrer patologias de cabeça com formas aberrantes, defeitos de peça intermediária e cauda fortemente enrolada; aqueles defeitos ocorridos durante o transporte pelo sistema de ductos, principalmente o epidídimo, como as com defeitos secundários, onde podem ocorrer persistência de gotas citoplasmáticas e dobras de peça intermediária e cauda (Howard, 1993; Wildt et al., 1996).

Amostras coletadas do epidídimo apresentam maior percentagem de espermatozoides com alterações morfológicas, com valores variando de 36% a 54% (Goodrowe & Hay, 1993; Lengwinat & Blottner, 1994). Isso ocorre principalmente devido ao fato dos espermatozoides continuarem o processo de maturação no epidídimo e vasos deferentes, logo, amostras coletadas nessas regiões possuem formas imaturas dessa célula (Luvoni, G. C., Kalchshmidt, E., Leoni, S. & Ruggiero, C., 2003). No entanto, Neubauer et al. (2004) observaram não haver diferenças entre amostras coletadas por eletroejaculação e diretamente do epidídimo.

De acordo com Swanson et al. (1996) a avaliação do sêmen de felídeos silvestres foi descrita com o seguinte procedimento: “Os espermatozoides recolhidos foram avaliados imediatamente pela percentagem de motilidade e pelo grau de movimento progressivo (Howard et al., 1986). Uma amostra (5 a 10 μL) foi fixada em 3% (V/V) de glutaraldeído e depois avaliada para obter-se a morfologia do sêmen (200 espermatozoides por ejaculação) usando-se um microscópio de contraste de fase (1000x) para identificar malformações específicas (Howard et al., 1986). A concentração de sêmen ($\times 10^6 \text{ mL}^{-1}$) foi determinada com 5 μL de sêmen natural (sem congelar), utilizando-se uma Câmara Hematimétrica (Howard et al., 1986) e o pH do sêmen foi aferido usando-se uma fita EM Science Gilbstown, MS”.

As membranas de algumas organelas, como as do acrossomo, são especialmente sensíveis aos danos causados pelo resfriamento (Watson, 1995). Assim, é muito importante avaliar a integridade dessas membranas ao se estudar novos métodos de refrigeração e congelamento de sêmen. No entanto, a avaliação acrossomal nos felídeos é dificultada pelo fato dessas espécies apresentarem um acrossomo estreito e de difícil visualização (Donoghue, A. M., Johnston, L. A., Munson, L., Brown, J. L. & Wildt, D. E., 1992; Howard, 1993).

A avaliação da integridade acrossômica é necessária para a avaliação do sêmen, pois o acrossoma é essencial para o processo de fertilização. A morfologia acrossômica é avaliada usando um microscópio de contraste de fase (1000x) e é dividida em quatro

categorias: 1) ápice normal, crescente e sem saliência no acrossoma; 2) ápice defeituoso, com forma irregular no ápice do acrossoma; 3) falta do ápice, com ápice inexistente, mas com uma capa acrossômica firmemente aderida ao núcleo; 4) capa acrossômica solta, com a capa acrossômica desprendida e vesiculada (Howard, 1993).

As patologias espermáticas associadas à infertilidade são provavelmente similares nos mamíferos, entretanto sabe-se que a importância de determinadas alterações, bem como sua frequência, variam entre as espécies, tornando necessário o estabelecimento de um padrão andrológico espécie-específico (Oettle, 1993).

2.6. Criopreservação do sêmen

Para conservar sêmen mantendo uma boa qualidade, é importante saber características fisiológicas deste material. Algumas particularidades são espécie-específicas, como demonstrado por experimentos com resultados ruins obtidos pelo congelamento de sêmen felino utilizando os mesmos diluentes e protocolos usados para bovinos.

Atualmente existem algumas descrições de protocolos de congelamento de sêmen em gato doméstico (Lengwinat & Blottner, 1994; Axné & Linde-Forsberg, 2002; Zambelli, D., Caneppele, B., Castagnetti, C. & Belluzzi, S., 2002; Luvoni et al., 2003) e em felídeos selvagens (Howard, 1993; Swanson et al., 1996; Pukazhenthil et al., 2001). Em jaguatirica, foi relatado congelamento de sêmen por Swanson et al. (1996), Morais (2001), Swanson et al. (2003), Tebet (2004) e Baudi (2005).

Protocolos de congelamento podem ser usados para espermatozoides ejaculados ou provenientes do epidídimo. Entretanto, certos aspectos do sêmen felino fazem com que a criopreservação do espermatozoide se torne particularmente intrigante se comparada com outras espécies em que essa tecnologia é rotineiramente aplicada (Luvoni, G. C., Cchigioni, S. & Beccaglia, M., 2006).

Protocolos de criopreservação expõem as células espermáticas a inúmeras situações de estresse como as variações de temperatura e exposição a temperaturas não fisiológicas, estresse osmótico pelos elevados gradientes de concentração de solutos do meio diluidor de congelamento e pela formação e dissolução de cristais de gelo no meio extracelular, os quais comprometem sua viabilidade (Watson & Martin, 2000).

Para minimizar os efeitos estressantes do congelamento, algumas substâncias crioprotetoras são adicionadas ao sêmen, promovendo alterações das propriedades

físicas da solução. Estes agentes crioprotetores podem penetrar ou não a membrana plasmática, dependendo do seu peso molecular (Amann & Pickett, 1987). O crioprotetor mais utilizado para espermatozóides é o glicerol (Watson, 1990). Porém, o glicerol apresenta efeito tóxico sobre o espermatozóide de acordo com a concentração utilizada, a temperatura e a espécie estudada (Fahy, 1986; England, 1993; Holt, 2000; Santos, I. W., Lima, V. F. M. H., Nisfeld, L. C. & Ribeiro, A. P. C., 2003; Pesch & Bergmenn, 2006). Estes efeitos parecem estar associados a alterações da viscosidade do citoplasma que possivelmente inibem processos metabólicos que envolvam difusão de solutos (Holt, 2000).

Em felídeos foram utilizados dois crioprotetores permeáveis em processos de congelamento de sêmen, o glicerol e o dimetil-sulfóxido (DMSO) (Pukazhenth, B., Spindler, R., Wildt, D., Bush, L. M & Howard, J. G., 2002). O sucesso na criopreservação de espermatozóides do gato doméstico foi apresentado no início dos anos 70, usando métodos descritos para trabalho com espermatozóides de cão. Isso envolveu o sêmen adicionado a um criodiluinte (20% gema de ovo, 11% lactose e 4% glicerol) em gelo seco, seguido por imersão e armazenamento de *pellets* no nitrogênio líquido. (Platz Jr., C. C., Wildt, D. E. & Seager, W. J., 1978).

Axnér & Linde-Forsberg (2002) descreveram o seguinte protocolo para criopreservação de sêmen em gato doméstico, utilizando palhetas para envase: “A amostra do sêmen é centrifugada a 700G por 6 min. e o sêmen é re-suspenso em Uppsala Equex Extender 1, para dobrar a concentração final desejada do sêmen. A melhor concentração para criopreservação de espermatozóides de gatos ainda não foi determinada. Depois de uma hora de resfriamento da temperatura ambiente para 4°C em um volume igual de Uppsala Equex Extender 2, o sêmen do gato é então colocado em palhetas de 0,25 mL e congelado, com os tubos sendo colocados em suportes, que são presos em uma grade, que é acondicionada em três etapas para dentro de um botijão (Apolo SX-18 LN, MVE Cryogenetics, Nova Praga, Minnessota, EUA). O botijão deve conter 16 a 18 cm de nitrogênio líquido, e a grade é mantida por 2, 2 e 1 minuto a 7, 13 e 20cm abaixo da abertura do botijão. As palhetas são descongeladas em água, a 37°C, por 15s e o sêmen é acondicionado em um tubo com o mesmo volume de um meio de descongelamento Uppsala Equex Thaw a 37°C para permitir o reequilíbrio a essa temperatura com ausência de luz, por 5 min. antes do exame e de proceder a Inseminação Artificial”.

Outro exemplo de diluidor que foi usado para o armazenamento de sêmen resfriado de gato e para a criopreservação é o meio de preservação com Tes-Tris gema

de ovo, com composição a base de ácido N-Trishidroximetil-metil2-aminometanosulfônico (Tes) 11,2g em 150 mL de água destilada, Trishidroximetil-aminometano (Tris) 2,9g em 75 mL de água destilada, gema de ovo 15 – 20%, glicerol (pode ser omitido para resfriamento) 7 – 7,5%, penicilina G 1000UI/mL, estreptomicina 1 mg/mL, sendo titulado para pH 7,4 (Lengwinat & Blottner, 1994).

Tsutsui et al. (2000) congelaram sêmen de gato doméstico em um diluente a base de gema de ovo, tris-frutose, ácido cítrico em uma solução de citrato de sódio e gema de ovo e relataram taxa de prenhez de 57% (8/14), quando utilizaram 50×10^6 espermatozóides para inseminação intra-uterina em fêmeas com cio natural.

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, sendo que o *Leopardus tigrinus* apresentou decréscimo marcante no índice de motilidade progressiva (média de 36,3 pontos).

Um diluente ideal para 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 (Luvoni et al., 2003).

Zambelli et al. (2002) testaram cinco curvas de resfriamento e congelamento para sêmen felino, utilizando um diluente à base de Tris, gema de ovo e glicerol. Após o processo de diluição, resfriaram as doses a uma taxa de 0,2 °C/s, por 20 min. deixando em equilíbrio mais 25 min. a 5°C, para então submeter ao processo de congelamento com auxílio de vapor de nitrogênio em um container. As amostras foram congeladas com taxas de queda de temperatura de 3,85; 9; 22,8; 36 e 43°C/min, sendo observados melhores resultados para motilidade espermática e menores danos acrossomais com as taxas de congelamento mais lentas a 3,85 °C/min, utilizando uma máquina de congelação (Cell Freezer R204).

Tsutsui et al. (2000) descreveram o seguinte protocolo para resfriamento e congelamento de sêmen felino: inicialmente o sêmen era resfriado até 4°C, quando eram completadas as etapas de diluição e as amostras permaneciam em equilíbrio por uma hora. As condições de temperatura do freezer eram – 1°C/min de 4°C até – 1°C; –

33°C/min. de – 1 até – 50° C e – 58,4 °C/min de – 50 °C até – 196 °C, quando o sêmen era transferido para um container com nitrogênio líquido.

2.7. Avaliação do sêmen pós-descongelamento

A longevidade espermática *in vitro* pode ser avaliada pela incubação do sêmen à temperatura corporal no intuito de mimetizar as condições encontradas no trato genital feminino (Teste de Termorresistência). Durante o teste de termorresistência o sêmen descongelado é incubado a temperaturas que variam de 37 a 39°C por períodos de até 6 horas, durante o qual se avalia a movimentação espermática (Fontbonne & Badinand, 1993; Peña, A. I., Barrio, F., Quintela, L. A. & Herradón, P. G., 1998). Este teste é tido como um bom preditor da fertilidade espermática em várias espécies e baixas taxas de sobrevivência no teste de termorresistência tem sido associadas com baixa fertilidade (England, 1993). A característica de baixa termorresistência, entretanto, não é necessariamente associada à baixa fertilidade, visto que em alguns estudos, amostras de sêmen com relativo baixo desempenho no teste de termorresistência apresentaram taxas de fertilidade normais (Cardoso, R. C. S., Silva, A. R. & Silva, L. D. M., 2005).

As membranas acrossômicas são facilmente prejudicadas durante o congelamento e descongelamento. Portanto, a avaliação do estado acrossômico é um importante critério para a determinação das habilidades crioprotetoras dos vários diluentes e métodos de congelamento (Howard, 1993).

Pope, C. E., Turne, J. L., Quatman, S. P. & Dresser, B. L. (1991) descreveram uma técnica para avaliação da integridade acrossomal em sêmen felino, utilizando um corante à base de rosa bengala 1%, *fast green* 1% e álcool etílico 40% em 0,1 M de ácido cítrico e 0,2 M de fosfato de sódio.

A integridade e viabilidade da membrana espermática podem ser avaliadas também através do teste hiposmótico (HOS) (Spittaler & Tyler, 1985). O teste hiposmótico baseia-se na reação de enrolamento da cauda do espermatozóide intacto, com membrana citoplasmática funcional quando exposto a um meio hiposmótico (England, 1993).

Para realização do Teste Hiposmótico, os espermatozóides são incubados em uma solução hiposmótica (150mOSM) e posteriormente avaliados quanto à sua morfologia sob contraste de fase. As células espermáticas íntegras apresentam enrolamento de caudas, evento que pode ser visualizado através de microscopia de

contraste de fase. A percentagem de espermatozóides com enrolamento de cauda, ou seja, íntegros, pode então ser computada (Kumi-Diaka, 1993).

Watson & Martin (2000) demonstraram as causas da redução da fertilidade com a utilização de sêmen congelado. São elas: a mudança de temperatura, estresse criopreservativo e formação e dissolução de cristais de gelo. Concluiu com isso, que são inúmeros os efeitos da criopreservação que causam danos letais ou diminuem a função dos espermatozóides. E estudos da fisiologia dos mesmos e desenvolvimento das técnicas de criopreservação têm muito a contribuir para a preservação das espécies futuras.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

- Amann, R. P., & Pickett, B. W. (1987). Principles of cryopreservation and review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Vet. Sci.*, 7, 143-173.
- Axnér, E., & Linde-Forsberg, C. (2002). Semen collection and assessment, and artificial insemination in the cat. In P. W. Concannon, G. England, J. Versteegem & C. Linde-Forsberg, *Recent advances in small animal reproduction*. New York: International Veterinary Information Service.
- 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 de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil.
- Bianchi, R. de C. (2001). *Estudo comparativo da dieta da jaguatirica Leopardus pardalis (Linnaeus, 1758) em Mata Atlântica*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Brasil.
- Bisbal, E. (1986). Food habits of some neotropical felids in Venezuela (Mammalia: Carnivora). *Mammalia*, 50(3), 329-339.
- Blom, E. (1950). A one minute live-dead sperm stain by means of eosine nicrosine. *Fertil. Steril.*, 1, 176-177.
- Brazilian Ocelot*. (2008). Recuperado em 10 de dezembro, 2008 de <http://www.senecaparkzoo.org/resources/pdf/ocelot.pdf>

¹ Referências bibliográficas apresentadas segundo as normas da American Psychological Association [APA]. (2001). *Publication manual of the American Psychological Association* (5th ed.). Washington, DC: Author.

- Cardoso, R. C. S., Silva, A. R., & Silva, L. D. M. (2005). Métodos de avaliação do sêmen canino congelado. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 29(314), 179-187.
- Convenção para o Comércio Internacional de Espécies Ameaçadas da Fauna e Flora Selvagem [CITES]. (2008). *The CITES Appendices*. Recuperado em 12 de dezembro, 2008, de <http://www.cites.org/eng/app/index.shtml>
- Crawshaw JR., P. G., & Quigley, H. B. (1989). Notes on ocelot movement and activity in the Pantanal region, Brazil. *Biotropica*, 21(4), 377-379.
- Cubas, Z. S., Silva, J. C. R., & Catão-Dias, J. L. (2006). *Tratado de animais selvagens*. São Paulo: Roca.
- Dillon, A. (2005). *Ocelot density and home range in Belize, Central America: camera-trapping and radio telemetry*. Master's thesis, Virginia Polytechnic Institute and State University, Virginia, USA.
- Discovery Travel World. (2009). *Ocelot*. Recuperado em 03 de janeiro, 2009, de http://www.1-costaricalink.com/costa_rica_fauna/wildlife_images/ocelot.jpg
- Donoghue, A. M., Johnston, L. A., Munson, L., Brown, J. L., & Wildt, D. E. (1992). Influence of gonadotropin treatment interval on follicular maturation, *in vitro* fertilization, circulating steroid concentrations, and subsequent luteal function in the domestic cat. *Biol Reprod*, 46, 972-980.
- Eaton, R. L. (1977). Breeding propagation and biology of the ocelot (*Leopardus pardalis*). *Zool. Garten.*, 47, 9-23.
- Eaton, R. L. (1978). Why some felids copulate so much: a model for the evolution of copulation frequency. *Carniv.*, 1, 42-51.
- Eaton, R. L. (1984). Surgery of smaller felid breeding. *Zool. Garten.*, 54(1/2), 101-120.
- Emmons, L. H. (1987). Comparative feeding ecology of felids in a neotropical rainforest. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 20(4), 271-283.
- Emmons, L. H. (1988). A field study of ocelots (*Felis pardalis*) in Peru. *Rev. Ecol. (Terre Vie)*, 43, 133-157.

- England, G. C. (1993). Criopreservation of dog semen: a review. *J. Reprod. Fert. Suppl*, 47, 234-255.
- Fagen, R. M., & Wiley, K. S. (1978). Felid paedomorphosis with special reference to *Leopardus*. *Carniv.*, 1, 72-81.
- Fahy, G. M. (1986). The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology. *Cryobiology*, 23(1), 1-13.
- Farrell, L. E., Roman, J., & Sunquist, M. E. (2000). Dietary separation of sympatric carnivores identified by molecular analysis of scats. *Molecular Ecology*, 9, 1583-1590.
- Fontbonne, A., & Badinand, F. (1993). Estudios on freezing dog spermatozoa: effect of glycerol on motility after thawing. *J. Reprod. Fert. Suppl*, 47, 531-532.
- Goodrowe, K. L., & Hay, M. (1993). Characteristics and zona binding ability of fresh and cooled cat epididymal spermatozoa. *Theriogenology*, 40, 967-975.
- Green, R. (1991). *Wild cat species of the world*. Plymouth, UK: Basset Publications.
- Gruffydd-Jones, T. J. (1993). Disorders of the reproductive system. In J. Willis & A. Wolf, *Handbook of Feline Medicine* (pp.213-222). Oxford, UK: Pergamon Press.
- Guimarães, M. A. B. V. (2002). Biotecnologia aplicada aos animais silvestres: aspectos éticos e conservacionistas. *Revista Brasileira Reprodução Animal*, 26(2), 58-61.
- Holt, W. V. (2000). Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, 62(1-3), 3-22.
- Howard, J. G., Bush, M., & Wildt, D. E. (1986). Semen collection, analysis and cryopreservation in nondomestic mammals. In D. A. Morrow, *Current Therapy in Theriogenology* (2nd ed.) (pp.1047-1053). Philadelphia: W.B. Saunders Co.
- Howard, J. G. (1993). Semen collection and analysis in nondomestic carnivores. In M. E. Fowler, *Zoo and wild animal medicine* (3rd ed.) (pp.390-399). Philadelphia: W.B. Saunders Co.

- Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis [IBAMA]. (2003). *Lista oficial da fauna brasileira ameaçada de extinção*. Recuperado em 13 de dezembro, 2008, de <http://www.ibama.gov.br>
- International Union for Nature Conservation [IUCN]. (1996). *Status survey and conservation action plan wild cats*. Cambridge: IUCN/SSC Cat Special Group.
- Jacob, A. A. (2002). *Ecologia e conservação da jaguatirica (Leopardus pardalis) no parque estadual Morro do Diabo, Pontal do Paranapanema, SP*. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, Brasília, Brasil.
- Kretser, D. M., & Kerr, J. B. (1994). The cytology of testis. In E. Knobil & J. D. Neill, *The physiology of reproduction* (2nd ed.) (pp.1177-1290). New York: Raven Press.
- Kumi-Diaka, J. (1993). Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. *Theriogenology*, 39, 1279-1289.
- Lengwinat, T., & Blottner, S. (1994). In vitro fertilization of follicular oocytes of domestic cat using fresh and cryopreserved epididymal spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 35, 291-301.
- Luvoni, G. C., Kalchschmidt, E., Leoni, S., & Ruggiero, C. (2003). Review conservation of feline semen part I: cooling and freezing protocols. *J Feline Med Surg*, 5, 203-208.
- Luvoni, G. C., Cchigioni, S., & Beccaglia, M. (2006). Embryo production in dogs: from *in vitro* fertilization to cloning. *Reprod. Dom. Ani.*, 14, 286-290.
- Machado, A. B. M., Fonseca, G. A. B., Machado, R. B., Aguiar, L. M., & Lins, L. V. (1998). *Livro brasileiro das espécies ameaçadas de extinção da fauna de Minas Gerais*. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas.
- Mann, T., & Lutwak-Mann, C. (1981). *Male reproductive function and semen*. Berlin: Springer Verlag.
- 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 de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil.

- Mellen, J. D. (1990). *Reproductive behaviour of small captive exotic cats (Felis spp.)*. Doctoral Thesis, University California, Davis.
- Miller, A M., Roelke, M. E., Goodrowe, K. L., Howard, J. G., & Wildt, D. E. (1990). Oocyte recovery, maturation and fertilization *in vitro* in the puma (*Felis concolor*). *Journal of Reproduction and Fertility*, 88, 249-258.
- Miller, B., & Rabinowitz, A. (2002). Why conserve jaguar? In R. A. Medellin, C. Chietkiewicz, K. H. Redford, J. G. Robinson, E. Anderson & E. A. Taber, *El jaguar en el nuevo milenio*. Mexico: Universidad Nacional Autonoma de Mexico/ Wildlife Conservation Society.
- Moraes, W., Morais, R. N., Moreira, N., Lacerda, O.; Gomes, M. L. F., Mucciolo, R. G. et al. (1997). Successful artificial insemination after exogenous gonadotropin treatment in the ocelot (*Leopardus pardalis*) and tigrina (*Leopardus tigrina*). *Proceedings American Association of Zoo Veterinarians*, (pp.334-336). Houston, TX.
- 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 esteroideogênica) de machos em cativeiro, incluindo variações sazonais*. Tese de Doutorado, Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Morais, R. N. (2001). Reproduction in small felid males. In M. E. Fowler & Z. S. Cubas, *Biology, medicine and surgery of South American wild animals* (pp.312-316). Iowa: Iowa State University Press.
- Morais, R. N., Mucciolo, R. G., Gomes, M. L. F., Lacerda, O., Moraes, W., Moreira, N. et al. (2002). Seasonal analysis of semen characteristics, serum testosterone and fecal androgens in the ocelot (*Leopardus pardalis*), margay (*L. wiedii*) and tigrina (*L. tigrinus*). *Theriogenology*, 57(8), 2027-2041.
- Morato, R. G., & Barnabé, R. C. (1998). Biotécnicas de reprodução aplicadas à preservação de felídeos selvagens. *Clin. Vet.*, 12, 24-26.
- Moreira, N. (2001). *Reprodução e estresse em fêmeas de felídeos do gênero Leopardus*. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil.
- Murray, J. L., & Gardener, G. L. (1997). *Leopardus pardalis*. *Mammalian Species*, 548, 1-10.

- Neubauer, K., Jewgenow, K., Blottner, S., Wildt, D. E., & Pukazhenthil, B. S. (2004). Quantity rather than quality in teratospermic males: a histomorphometric and flow cytometric evaluation of spermatogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). *Biology of Reproduction*, 71(5), 1517-1524.
- No Extinction [NEX]. (2008). *Mapa de distribuição da jaguatirica (Leopardus pardalis) no continente americano*. Recuperado em 20 de dezembro, 2008, de <http://www.nex.org.br/images/mapas/jaguaririca.gif>
- Oettle, E. E., & Soley, J. T. (1988). Sperm abnormalities in the dog: a light and electron microscopy study. *Vet Med Rev*, 59, 28-70.
- Oettle, E. E. (1993). Sperm morphology and fertility in the dog. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 47, 257-260.
- Oliveira, T. G., & Cassaro, K. (1999). *Guia de identificação de felinos brasileiros (2a ed.)*. São Paulo: Sociedade de Zoológicos.
- Peña, A. I., Barrio, F., Quintela, L. A., & Herradón, P. G. (1998). Effects of different glycerol treatments on frozen-thawed dog sperm longevity and acrosomal integrity. *Theriogenology*, 50, 163-174.
- Pesch, S., & Bergmann, M. (2006). Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. *Micron*, 37(7), 597-612.
- Pineda, M. H., Dooley, M. P., & Martin, P. A. (1984). Long-term study on the effects of electroejaculation on seminal characteristics of the domestic cat. *Am J Vet Res*, 45(5), 1038-1041.
- 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 (pp.1053-1055). Cracow, Poland.
- Platz Jr., C. C., & Seager, W. J., (1978). Semen collection by electroejaculation in the domestic cat. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 173(10), 1353-1355.
- Platz Jr., C. C., Wildt, D. E., & Seager, W. J. (1978). Pregnancy in the domestic cat after artificial insemination with previously frozen spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 52, 279-282.

- Pope, C. E., Turne, J. L.; Quatman, S. P, & Dresser, B. L. (1991). Semen storage in the domestic felid: a comparison of cryopreservation methods and storage temperatures. *Biol Reprod*, 44(Suppl 1), 117.
- Pukazhenth, B., Wildt, D. E., & Howard, J. G. (2001). The phenomenon and significance of teratospermia in felids. *Journal of Reproduction and Fertility*, 57, 423-433.
- Pukazhenth, B., Spindler, R., Wildt, D., Bush, L. M., & Howard, J. G. (2002). Osmotic properties of spermatozoa from felids producing different proportions of pleiomorfisms: influence of adithing and removing cryoprotectant. *Cryobiology*, 44, 288-300.
- 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 de Mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Salisbury, G. W., Birge, W.J., Torte, L. de la & Lodge, J. R. (1961). Decrease in nuclear Feulgen-positive material (DNA) upon aging in *in vitro* storage of bovine spermatozoa. *J. Biophys. Bio-chem. Cytol.*, 10, 353.
- Santos, I. W., Lima, V. F. M. H., Nisfeld, L. C., & Ribeiro, A. P. C. (2003). Congelação do sêmen canino comparando diferentes concentrações de glicerol e diferentes tempos de equilíbrio. *Archives of Veterinary Science*, 8(2), 57-62.
- Sarti, P. (2006). *Avaliação morfométrica do testículo e da espermatogênese de jaguatiricas (Leopardus pardalis Linnaeus, 1758) adultas*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.
- Sharpe, R. M. (1994). Regulation of spermatogenesis. In E. Knobil & J. D. Neil, *The physiology of reproduction* (2a ed.) (pp.1363-1434). New York: Raven Press.
- Sociedade de Zoológicos do Brasil [SBZ]. (2002). *Programa senso de animais em cativeiro*. Recuperado em 14 de janeiro, 2009, de <http://www.szb.org.br>
- Spittaler, P. J., & Tyler, J. P. P. (1985). Further evaluation of a simple test for determining the integrity of spermatozoal membrane. *Clin Reprod Fertil*, 3, 187-190.

- 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*). *Journal of Reproduction and Fertility*, 106, 87-94.
- Swanson, W. F. (1998). Curso de Extensão – felinos selvagens. In *Biotécnicas reprodutivas e conservação* (pp.5-10). Curitiba, PR: Setor de Ciências Biológicas, UFPR.
- Swanson, W. F. (2001). Reproductive biotechnology and conservation of the forgotten felids – the small cats. *Proc 1st Inter Symp Assisted Reproductive Technology for Conservation & Genetic Management of Wildlife*, (pp.100-200).
- 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 Biol*, 22, 421-441.
- Swanson, W. F., & Brown, J. L. (2004). International training programs in reproductive sciences for conservation of Latin American felids. *Animal Reproduction Science*, 82, 21-34.
- 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 de Doutorado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu, SP, Brasil.
- Trolle, M., & Kery, M. (2003). Estimation of ocelot density in the Pantanal using capture-recapture analysis of camera-trapping data. *Journal of Mammalogy*, 84(2), 607-614.
- Tsutsui, T., Tanaka, A., Takagi, Y., Nakagawa, K., Fugimoto, Y., Murai, M. et al. (2000). Unilateral intrauterine horn insemination of frozen semen in cats. *J Vet Med Sci*, 62,1247-1251.
- Watson, P. F. (1990). Artificial insemination and preservation of the semen. In *Marshall's physiology of reproduction* (4th ed.) (pp.747-869). Edinburgh: Churchill Livingstone.
- Watson, P. F. (1995). Recent developments and concepts in cryopreservation of sperm and assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.*, 7, 871-892.

- Watson, P. F., & Martin, I. C. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, 60(1), 481-492.
- Wieloch, D. R., Veado, B. V., & Furtado, D. B. (1997). *Cadernos da Fundação Zoológica Botânica I - Animais do Zoológico* (pp.165-166). Belo Horizonte: Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte: Serviço de educação ambiental.
- 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*, 29, 1019-1025.
- Wildt, D. E., Schiewe, M. C., Schmidt, P. M., Gooddrowe, K. L., Howard, J. G., O'Brien, S. J. et al. (1986). Developing animal model systems for embryo technologies in rare and endangered wildlife. *Theriogenology*. Los altos, 25(1), 33-51.
- Wildt, D. E., Bush, M., Goodrowe, K. L., Packer, C., Pusey, A. E., Brown, J. L. et al. (1987). Reproductive and genetic consequences of founding isolated lion populations. *Nature*, 329, 328-331.
- Wildt, D. E., Bush, M., & O'Brien, S. J. (1993). *Training manual: reproduction, genetics and veterinary medicine*. Front Royal: Center for New Opportunities in Animal Health Sciences (NOAHS), Conservation and Research Center, National Zoo, Smithsonian Institution.
- Wildt, D. E., Bush, M., Howard, J. G., Grisham, J., Kramer, L., & O'Brien, S. J. (1996). Summary report: health, genetics and reproductive physiology of Namibian cheetahs and the collection and storage of spermatozoa, blood and tissue. *1993 International Cheetah's (Acinonyx jubatus) studbook*. Section K2, 1-10. Marker-Kraus, L. (Ed.). Washington, DC: Smithsonian Institution's National Zoological Park's NOAHS Center.
- Ximenez, A. (1982). Notes on neotropical felids IX: *Felis (Leopardus) pardalis mitis*. *Comm. Zool. Mus. Hist. Nat. Montevideo*, 12(168), 1-7.
- Zambelli, D., Caneppele, B., Castagnetti, C., & Belluzzi, S. (2002). Cryopreservation of cat semen in straws: comparison of five different freezing rates. *Reprod. Dom. Anim.*, 37, 310-313.

4. ARTIGO I

PROCOLOS DE COLETA DE SÊMEN POR ELETROEJACULAÇÃO EM JAGUATIRICAS (*Leopardus pardalis* Linnaeus, 1758)

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo principal o estudo de dois protocolos para coleta de sêmen por eletroejaculação em jaguatiricas adultas de cativeiro. Foram comparadas a técnica convencionalmente preconizada para felídeos (80 estímulos elétricos em 3 séries de 2 a 6V) e uma adaptação na qual se preconiza o esvaziamento e lavagem da bexiga, para se evitar a contaminação do sêmen pela urina, e utilizando menor número de estímulos elétricos idênticos porém com uma voltagem mais alta (35 estímulos elétricos em 7 séries de 5 estímulos de 16V). Foram utilizados seis animais adultos. Em quatro foram realizadas ambos os protocolos sendo realizadas três coletas de sêmen em cada técnica. Realizaram-se pesagem, biometria corporal e testicular e as características do sêmen avaliadas foram: aspecto, volume espermático, motilidade espermática, vigor, concentração espermática, total de espermatozóides por ejaculado e índice espermático. Ambos os protocolos mostraram eficiência para a coleta de amostras de sêmen, porém, com o protocolo modificado, obteve-se em média valor 6 vezes maior para volume espermático (1,2 mL), cerca de 3,6 vezes maior de concentração espermática por mililitro de sêmen ($456,6 \times 10^6$) e 18 vezes maior de número total de espermatozóides por ejaculado ($667,3 \times 10^6$). O protocolo modificado se mostrou ainda mais rápido e livre de contaminação por urina. Os dados qualitativos dos espermatozóides como vigor, motilidade e índice espermático demonstraram ótima qualidade espermática e foram compatíveis aos padrões seminais de felinos adultos.

Palavras-chave: Jaguatirica, Sêmen, Eletroejaculação

COMPARATIVE STUDY BETWEEN TWO SEMEN COLLECTION PROTOCOLS IN OCELOTS (*Leopardus pardalis* Linnaeus, 1758)

ABSTRACT

This study had, as a main objective, two protocols for semen collection by eletroejaculation in adult captive ocelots. Were compared the conventional technique applied in felids (80 electric stimuli in 3 series from 2 to 6V), and an adaptation that praise the previous emptying and washing of the bladder to avoid semen contamination by urine, and uses a minor number of identical electric stimulus, however with a higher voltage. (35 electric stimuli in 7 series of 5 stimuli of 16V). A total of six animals were used, and in four of them were tested the two protocols. Three semen collections were made in each technique for each animal. The weight, corporal and testicular measurements were realized, and the semen characteristics evaluated were the color, consistency, sperm volume, sperm motility, sperm progressive status, sperm concentration, total sperm of ejaculate, and sperm motility index. Both protocols showed efficiency, but the modified protocol, got values on average 6 times bigger for sperm volume (1,2 mL), about 3,6 times bigger of sperm concentration for milliliter of semen ($456,6 \times 10^6$), and 18 times bigger of total number of sperm per ejaculate ($667,3 \times 10^6$). The modified protocol showed fast and free of contamination for urine. The qualitative data of the spermatozoa as sperm progressive status, sperm motility and sperm motility index had demonstrated excellent sperm quality and had been compatible with the adult felids.

Keywords: Ocelot, Semen, Eletroejaculation

1. INTRODUÇÃO

Os felinos silvestres estão entre as espécies mais ameaçadas do mundo (International Union for Nature Conservation [IUCN], 1996). No Brasil ocorrem oito espécies de felinos de grande, médio e pequeno porte. São elas a onça-pintada (*Panthera onca*), a onça-parda (*Puma concolor*), a jaguatirica (*Leopardus pardalis*), o gato-maracajá (*Leopardus wiedi*), o gato-do-mato-grande (*Leopardus geoffroyi*), o gato-palheiro (*Leopardus colocolo*), o gato-mourisco (*Puma yagouaroundi*) e o gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*) (Cubas, Z. S., Silva, J. C. R. & Catão-Dias, J. L., 2006).

A jaguatirica 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 20 kg (IUCN, 1996). Mede de 50 cm a 1 m de comprimento (além da cauda, que pode medir até 45 cm) (Wieloch, D. R., Veado, B. V. & Furtado, D. B., 1997). Apresenta hábitos diurnos e noturnos, e se alimenta de pequenos mamíferos, lagartos, aves e ovos (Ximenez, 1982; Bisbal, 1986; Emmons, 1987, 1988; Farrel, L. E., Roman, J. & Sunquist, M. E., 2000; Bianchi, 2001; Cubas et al., 2006). Ocorre em todo o Continente Americano do sul do Texas ao norte da Argentina (Murray & Gardner, 1997). No Brasil, ocorre em florestas úmidas, cerrado, campos e caatinga. É encontrada em todas as regiões do Brasil, exceto no sul do Rio Grande do Sul (Oliveira & Cassaro, 1999; Cubas et al., 2006).

Experimentações direcionadas à coleta e avaliação de sêmen de jaguatirica vêm sendo realizadas a fim de colaborar na tentativa de reprodução assistida dessa espécie em cativeiro (Howard, 1993; Swanson et al., 1996; Morais et al., 2002; Swanson et al., 2003; Queiroz, 2003; Baudi, 2005).

Embora coletas de sêmen em gatos domésticos possam ser realizadas com o uso de uma vagina artificial (Axnér & Linde-Forsberg, 2002), em felinos selvagens a eletroejaculação é o método mais utilizado para obtenção de sêmen, devido à dificuldade no condicionamento desses animais. Ejaculados obtidos por eletroejaculação em gatos, geralmente possuem maior volume, menor concentração, menor número de espermatozoides totais, quando em comparados com coletas por vagina artificial. Isto se deve à estimulação elétrica das glândulas acessórias (Axnér & Linde-Forsberg, 2002). A morfologia do sêmen colhido por uma vagina artificial não difere daquele colhido por eletroejaculação (Pukazhenthí, B., Wildt, D. E. & Howard, J. G., 2001). Estimulação elétrica e anestésias repetidas também não afetaram a

capacidade de ejaculação do gato doméstico (Pineda, M. H., Dooley, M. P. & Martin, P. A., 1984).

As características do sêmen e a resposta para as várias técnicas de coleta são espécie-específicas. O sêmen do carnívoro é muito sensível à manipulação e a manutenção da sua viabilidade depende do método de processamento. Muitas espécies de felídeos produzem grande quantidade de espermatozóides de morfologia anormal, o que parece estar relacionado com a perda da variabilidade genética. A manutenção da motilidade do sêmen *in vitro* é influenciada por inúmeros fatores, incluindo forma de coleta, meio de cultura, pH e temperatura. Em muitas espécies, a viabilidade do sêmen é comprometida pelos componentes do plasma seminal e a contaminação por urina no momento da coleta. O sêmen puro geralmente mantém a motilidade *in vitro* por no máximo duas horas (Howard, 1993).

Em carnívoros, os melhores resultados na coleta de sêmen por eletroejaculação, foram alcançados quando probes com eletrodos longitudinais foram usadas se comparadas àquelas com eletrodos circulares. O protocolo mais utilizado atualmente consiste em um total de 80 estímulos elétricos de 2 a 6V aplicados em três séries de 30, 30 e 20 estímulos (Wildt et al., 1983; Howard, J. G., Bush, M. & Wildt, D. E., 1986). Embora esta metodologia seja preconizada para a maioria dos carnívoros (Howard, 1993), pouco ou nenhum sucesso tem sido obtido em canídeos, além do volume e concentração espermática total obtidos de felídeos serem muito baixos e quase sempre contaminados com urina (Howard, 1993; Morais et al., 2002; Swanson et al., 2003; Queiroz, 2003; Baudi, 2005). Neste sentido, o presente trabalho objetivou a avaliação de alterações no protocolo de eletroejaculação preconizado na literatura para felinos, no intuito de melhoria na qualidade e quantidade do sêmen coletado em jaguatiricas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas seis jaguatiricas (*Leopardus pardalis*) macho adultas de cativeiro. Dois animais mantidos em criadouro conservacionista credenciado no município de Belo Horizonte, MG, (denominadas Jaguatirica 1 e Jaguatirica 2), dois animais provenientes do Centro de Triagem de Animais Silvestres da Universidade Federal de Viçosa (CETAS-UFV) (denominadas Jaguatirica 3 e Jaguatirica 4) e dois animais mantidos na Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte (denominadas

Jaguaririca 5 e Jaguaririca 6). Os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, registro número 50/2008, e pelo IBAMA, registro número 18675-1.

Após 12h de jejum os animais foram contidos com anestesia dissociativa pela combinação dos cloridratos de quetamina e xilazina, nas doses de 10 mg/kg e 2 mg/kg, respectivamente, por via intramuscular por meio de dardos anestésicos. Foi administrado sulfato de atropina na dose de 0,044 mg/kg via subcutânea para manutenção da normalidade da função cardíaca. Os animais tiveram seus parâmetros vitais aferidos e avaliados por um médico veterinário durante e após o procedimento, sendo monitorados a cada 15 minutos até que conseguissem manter-se em estação, garantindo uma recuperação pós-anestésica segura.

Com os animais anestesiados, foi realizada a pesagem dos mesmos em uma balança e a biometria corporal e testicular por meio de fita métrica e paquímetro digital. Para o cálculo do volume dos testículos foi utilizada a fórmula: $\frac{4}{3} \pi (ABC)$, sendo A, a metade do valor do comprimento, B, a metade do valor da largura e C, a metade do valor da espessura testicular mensurado percutaneamente e descontado da prega dupla de pele. Também foi mensurado o comprimento das regiões da glândula peniana coberta por espículas (Figura 1).

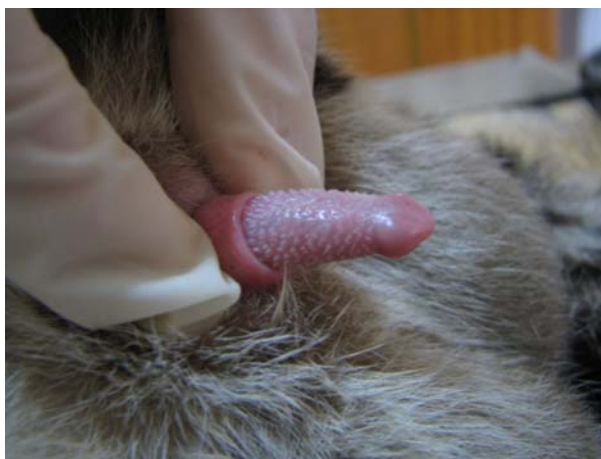


Figura 1: Região ocupada pelas espículas penianas na glândula em jaguaririca adulta.

Por meio de uma sonda uretral nº6 acoplada a uma seringa de 10 mL, a bexiga de cada animal foi esvaziada e lavada com solução fisiológica estéril, para evitar contaminação do sêmen pela urina (Figura 2).



Figura 2: Lavagem da bexiga via sonda uretral com solução fisiológica estéril em jaguaririca adulta.

Os procedimentos de coleta de sêmen foram realizados por meio de um aparelho eletroejaculador acoplado a uma probe retal de 9 cm de perímetro, provida de três eletrodos longitudinais (Figura 3). A probe foi devidamente lubrificada e introduzida no reto com os eletrodos longitudinais posicionados ventralmente. O pênis foi exposto e acoplado a um tubo plástico tipo Ependorff® previamente aquecido a temperatura de 38°C, sendo trocado a cada série de estímulos (Figura 4). Foi considerado apenas o volume espermático, ou seja, descontados os volumes de plasma seminal aspérmicos ou oligospérmicos.



Figura 3: Aparelho eletroejaculador com probe retal.



Figura 4: Coleta de sêmen pelo método de eletroejaculação em jaguatirica adulta.

Foram utilizados dois protocolos de eletroejaculação: o protocolo A preconizado e amplamente utilizado para coleta de sêmen em felinos, assim, em seis jaguatiricas adultas realizou-se a aplicação de 80 estímulos elétricos variando de 2 a 6V aplicados em 3 séries de 30, 30 e 20 estímulos; e no protocolo B foram aplicados, em quatro jaguatiricas adultas, de 5 a 7 séries cada uma com 5 estímulos idênticos de 16V. Cada estímulo com a duração de no máximo 3s, com intervalo de 3s entre eles e intervalo de 1min entre cada série.

O primeiro protocolo utilizado foi o A com três coletas em cada animal (seis animais) e, após esse período, foram realizadas três coletas em quatro animais com o protocolo B. Todas as coletas foram realizadas, com um intervalo de 15 dias entre elas. As características do sêmen avaliadas foram: aspecto, volume, motilidade espermática e vigor, total de espermatozóides por ejaculado e índice espermático.

O aspecto do sêmen foi analisado por visualização direta. O volume foi mensurado com a ajuda de uma micropipeta de volume ajustável para a obtenção precisa do volume do ejaculado. Imediatamente após esta análise, foi colocada uma gota do material em uma lâmina que foi coberta com lamínula, ambas previamente aquecidas a 38° C a fim de evitar choque térmico.

Em seguida, o sêmen foi avaliado quanto à motilidade espermática progressiva e ao vigor, este em uma escala de um a cinco. Utilizando-se um microscópio de luz monocular portátil (A. I. Handycop[®]) em aumento de 100x (Figura 5).



Figura 5: Avaliação do sêmen de jaguatirica adulta à fresco em microscópio portátil.

Para o cálculo da concentração espermática, uma fração de sêmen foi depositada em uma câmara de Neubauer em um microscópio de luz, e contados cinco quadrantes no campo. Foi utilizada a fórmula padrão: $C = 5 \times N \times 10 \times D \times 10^3$ espermatozoides/mL. Onde C é a concentração, 5 é o número de quadrantes contados da câmara, 10 é a altura entre câmara e lamínula, N é a média do número de espermatozoides contados na câmara, D é o fator de diluição da amostra e 10^3 corresponde à transformação de mm^3 para mL. O número total de espermatozoides por ejaculado foi calculado utilizando a fórmula: $NE = C \times V$, onde C é a concentração espermática e V é o volume do ejaculado.

Foi calculado também, o índice espermático pela fórmula: $IE = [M+(V \times 20)]/2$, em que M representa a motilidade e V o vigor espermático.

Para realização da análise estatística foram calculados os valores de média (M), desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV) e intervalo de confiança (IC) com estimativa de 5% de erro. Os cálculos foram realizados no programa Microsoft Office Excel[®] (2003).

3. RESULTADOS

O peso corporal registrado para jaguatiricas adultas em cativeiro foi em média 13,5kg, o comprimento focinho base da cauda 89,75cm, o comprimento da cauda 34,5cm, a altura do membro torácico 41,0cm, e os valores médios e desvios padrão, bem como o coeficiente de variação dos demais dados biométricos corporais das jaguatiricas foram dispostos na tabela 1.

Tabela 1: Peso corporal e biometria de jaguatiricas (n=6).

<i>Parâmetros</i>	<i>Média ± desvio padrão (CV)</i>
Peso corporal (Kg)	13,5 ± 2,07 (15,33)
Comprimento: focinho base da cauda (cm)	89,75 ± 3,4 (3,78)
Comprimento cauda (cm)	34,5 ± 0,6 (1,73)
Altura membro torácico (cm)	41,0 ± 0,7 (1,70)
Altura membro pélvico (cm)	41,8 ± 1,9 (4,54)
Diâmetro torácico (cm)	47,7 ± 1,7 (3,56)
Diâmetro cervical (cm)	29,8 ± 0,8 (2,68)
Largura face solear membro torácico (cm)	5,05 ± 0,3 (5,94)
Comprimento face solear membro torácico (cm)	4,7 ± 0,4 (8,51)
Largura face solear membro pélvico (cm)	4,3 ± 0,5 (11,62)
Comprimento face solear membro pélvico (cm)	4,4 ± 0,5 (11,36)

Nota: CV= Coeficiente de variação

O volume médio dos testículos direito e esquerdo foi, respectivamente, 8,45 e 9,39 mL, e os valores médios e os desvios padrão bem como o coeficiente de variação dos dados biométricos testiculares estão na tabela 2.

Tabela 2: Biometrias testiculares e comprimento da região peniana ocupada por espículas (n=6).

<i>Biometria testicular e comprimento da região de espículas</i>		<i>Média ± Desvio padrão (CV)</i>
Testículo direito	Comprimento (cm)	3,23 ± 0,15 (4,64)
	Largura (cm)	2,56 ± 0,29 (11,32)
	Espessura (cm)	2,61 ± 0,25 (9,57)
Testículo esquerdo	Comprimento (cm)	3,24 ± 0,20 (6,17)
	Largura (cm)	2,58 ± 0,16 (6,20)
	Espessura (cm)	2,85 ± 0,19 (6,66)
Prega dupla cutânea (cm)		0,25 ± 0,02 (8,0)
Volume testículo direito (mL)		8,45 ± 0,3 (8,61)
Volume testículo esquerdo (mL)		9,39 ± 0,3 (6,23)
Volume de ambos os testículos (mL)		17,84 ± 1,55 (7,39)
Comprimento da área de espículas (cm)		1,46 ± 0,08 (5,47)

Nota: CV= Coeficiente de variação

Na tabela 3 estão dispostos os valores referentes as 18 coletas de sêmen utilizando o protocolo A (n=6), para felinos na literatura, e as 12 coletas de sêmen utilizando o protocolo B (n=4), desenvolvido no experimento. Observa-se que com o protocolo A foram obtidos em média geral 0,2 mL de volume espermático total de sêmen, a uma concentração espermática de 126,6 milhões de espermatozoides por mililitro de sêmen, perfazendo um total de espermatozoides ejaculados de $37,1 \times 10^6$. Com o protocolo B obteve-se em média geral 1,2 mL de volume total de sêmen, a uma concentração espermática de 456,6 milhões de espermatozoides por mililitro de sêmen, perfazendo um total de espermatozoides ejaculados de $667,3 \times 10^6$. Em todos estes parâmetros observou-se diferença significativa entre os protocolos descritos ($p < 0,05$).

Tabela 3: Comparação entre os parâmetros aferidos na coleta de sêmen pelos protocolos A (n=6) e B (n=4) em jaguatiricas.

<i>Protocolo utilizado</i>	<i>Protocolo A</i> <i>Média ± DP (CV)</i> <i>(n' = 18)</i>	<i>Protocolo B</i> <i>Média ± DP (CV)</i> <i>(n' = 12)</i>
<i>Protocolo aferido</i>		
Voltagem de coleta	5V, 6V	16V
Aspecto	Turvo/Leitoso	Turvo/Leitoso
Volume espermático (mL)	0,2 ± 0,1 (5,0)	1,2 ± 0,7 (58,3)
Concentração Espermática (x10⁶)	134,0 ± 154,9 (114,9)	456,6 ± 198,5 (43,5)
Total de espermatozoides/ejaculado (x10⁶)	37,1 ± 48,4 (130,4)	667,3 ± 383,5 (57,4)
Motilidade espermática (%)	79,3 ± 7,7 (9,7)	88,7 ± 2,5 (2,8)
Vigor (0-5)	4,3 ± 0,2 (4,7)	4,0 ± 0,7 (17,5)
Índice espermático	83 ± 4,5 (5,4)	84,4 ± 8,3 (9,8)

Nota: n = Número de animais; n' = Número de coletas; DP = Desvio padrão; CV = Coeficiente de variação. ($\rho < 0.05$).

4. DISCUSSÃO

Wildt et al. (1983) descreveram um protocolo de eletroejaculação para coleta de sêmen de guepardos (*Acinonyx jubatus*) que tem sido utilizado como modelo para a coleta de sêmen em várias espécies de felinos selvagens como o leopardo (*Panthera pardus*) (Brown et al., 1989), tigre (*Panthera tigris*) (Donoghue et al., 1990), onça parda (*Puma concolor*) (Miller, A. M., Roelke, M. E., Goodrowe, K. L., Howard, J. G. & Wildt, D. E., 1990), jaguatirica (*Leopardus pardalis*) (Swanson et al., 1996; Baudi, 2005), onça pintada (*Panthera onça*) (Morato, 1997). Esta técnica baseia-se em uma grande quantidade de estímulos elétricos, através de eletrodo retal, em intensidade crescente, porém, na maioria destas espécies são relatadas quantidades totais pequenas de sêmen, com freqüente contaminação com urina (Queiroz, 2003). Este autor relata

uma grande contaminação com urina, em média cerca de 75% das amostras coletadas apresentavam ao menos uma fração de ejaculado contaminada. Também, Moraes et al. (2002) descreveram uma alta taxa de contaminação (69%) nas coletas nessa espécie. Amostras coletadas com motilidades inferiores a 60% e vigor 3 são geralmente consideradas suspeitas de contaminação com urina (Queiroz, 2003). Em vista desses resultados nas presentes experimentações, optou-se pelo esvaziamento e lavagem da bexiga com solução fisiológica estéril, previamente às coletas, as quais eliminaram a contaminação do sêmen com a urina.

Em jaguatiricas, não raramente são obtidas coletas aspérmicas e ou oligospérmicas, contendo apenas plasma seminal (Queiroz, 2003). Neste sentido, a maioria dos autores considera apenas os volumes espermáticos coletados. Embora Moraes et al. (2002) descrevam frações espermáticas médias de 1,4 mL, os demais autores descrevem nessa espécie, valores menores e muito próximos entre si, com o uso da técnica convencional. Assim, Queiroz (2003) descreve uma média de 0,4 mL; Howard (1993), 0,3 mL; Swanson et al. (2003), 0,6 mL; Baudi (2005), 0,66 e o presente estudo com 0,2 mL. Com relação à técnica proposta, foi obtido em média cerca de 1,2 mL em volume espermático e a concentração por mililitro de sêmen e número total de espermatozoides muito superiores ao descrito na literatura com a técnica convencional. Ou seja, no presente trabalho foi obtida uma média de $456,6 \times 10^6$ sptz/mL e $667,3 \times 10^6$ sptz totais no volume espermático, enquanto que nos resultados, empregando a técnica convencional, foram registradas uma amplitude de 28×10^6 e $8,4 \times 10^6$ a um máximo de $283,4 \times 10^6$ e $57,8 \times 10^6$ de concentração de sptz/mL e número total de sptz no volume espermático, respectivamente (Howard, 1993; Queiroz, 2003), incluindo-se nesta amplitude os resultados obtidos no presente experimento com o uso da técnica convencional.

A avaliação qualitativa de uma amostra de sêmen considera classicamente a quantidade de espermatozoides móveis e o vigor ou intensidade de movimento médio dos espermatozoides, na classificação e correlação com a capacidade fecundante. Esses métodos são subjetivos, e embora muitos autores os considerem insatisfatórios (Goodrowe & Hay, 1993; Howard, 1993), são amplamente utilizados. No sentido de estabelecer um índice considerando ao mesmo tempo a motilidade e vigor espermáticos, foi sugerido o índice espermático que expressa percentualmente a média resultante desses dois parâmetros. No presente estudo, embora uma diferença tenha sido observada entre a motilidade média das amostras obtidas nos dois diferentes protocolos testados ($p < 0,05$), não foram observadas diferenças significativas no vigor e no índice

espermático ($\rho > 0,05$). Valores estes se mostraram satisfatórios, porém próximos aos registrados na literatura para o sêmen fresco de jaguatirica, variando de 70,7% a 77,6% (Swanson et al., 2003; Morais et al., 2002), respectivamente.

5. CONCLUSÃO

O protocolo de coleta de sêmen sugerido no presente experimento, em jaguatiricas adultas, mostrou-se eficiente, com resultados satisfatórios muito superiores à técnica convencional quanto ao volume espermático, concentração de sptz por mililitro de sêmen e número total de espermatozóides ejaculados, com uso de um menor número de estímulos elétricos. O esvaziamento e lavagem prévios da bexiga, por meio de sondagem, eliminaram a contaminação por urina nas amostras coletadas. O protocolo proposto não diferiu quanto ao índice espermático das amostras em relação à técnica convencional.

6. BIBLIOGRAFIA²

Axnér, E., & Linde-Forsberg, C. (2002). Semen collection and assessment, and artificial insemination in the cat. In P. W. Concannon, G. England, J. Verstegem & C. Linde-Forsberg, *Recent advances in small animal reproduction*. New York: International Veterinary Information Service.

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 de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil.

Bianchi, R. de C. (2001). *Estudo comparativo da dieta da jaguatirica Leopardus pardalis (Linnaeus, 1758) em Mata Atlântica*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Brasil.

² Referências bibliográficas apresentadas segundo as normas da American Psychological Association [APA]. (2001). *Publication manual of the American Psychological Association* (5th ed.). Washington, DC: Author.

- Bisbal, E. (1986). Food habits of some neotropical felids in Venezuela (Mammalia: Carnivora). *Mammalia*, 50(3), 329-339.
- Brown, J. L., Wildt, D. E., Phillips, L. G., Seidensticker, J., Fernando, S. B. U., Miththapala, S. et al. (1989). Adrenal-pituitary-gonadal relationships and ejaculate characteristics in captive leopards (*Panthera pardus kotiya*) isolated on the island of Sri Lanka. *Journal of Reproduction and Fertility*, 85, 605-613.
- Cubas, Z. S., Silva, J. C. R., & Catão-Dias, J. L. (2006). *Tratado de animais selvagens*. São Paulo: Roca.
- Donoghue, A. M., Johnston, L. A., Seal, U. S., Armstrong, D. L., Tilson, R. L., Wolf, P. et al. (1990). *In vitro* fertilization and embryo development *in vitro* and *in vivo* in the tiger (*Panthera tigris*). *Biology of Reproduction*, 43, 733-744.
- Emmons, L. H. (1987). Comparative feeding ecology of felids in a neotropical rainforest. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 20(4), 271-283.
- Emmons, L. H. (1988). A field study of ocelots (*Felis pardalis*) in Peru. *Rev. Ecol. (Terre Vie)*, 43, 133-157.
- Farrell, L. E., Roman, J., & Sunquist, M. E. (2000). Dietary separation of sympatric carnivores identified by molecular analysis of scats. *Molecular Ecology*, 9, 1583-1590.
- Goodrowe, K. L., & Hay, M. (1993). Characteristics and zona binding ability of fresh and cooled cat epididymal spermatozoa. *Theriogenology*, 40, 967-975.
- Howard, J. G., Bush, M., & Wildt, D. E. (1986). Semen collection, analysis and cryopreservation in nondomestic mammals. In D. A. Morrow, *Current Therapy in Theriogenology* (2nd ed.) (pp.1047-1053). Philadelphia: W.B. Saunders Co.
- Howard, J. G. (1993). Semen collection and analysis in nondomestic carnivores. In M. E. Fowler, *Zoo and wild animal medicine* (3rd ed.) (pp.390-399). Philadelphia: W.B. Saunders Co.
- International Union for Nature Conservation [IUCN]. (1996). *Status survey and conservation action plan wild cats*. Cambridge: IUCN/SSC Cat Special Group.

- Miller, A M., Roelke, M. E., Goodrowe, K. L., Howard, J. G., & Wildt, D. E. (1990). Oocyte recovery, maturation and fertilization *in vitro* in the puma (*Felis concolor*). *Journal of Reproduction and Fertility*, 88, 249-258.
- Morais, R. N., Mucciolo, R. G., Gomes, M. L. F., Lacerda, O., Moraes, W., Moreira, N. et al. (2002). Seasonal analysis of semen characteristics, serum testosterone and fecal androgens in the ocelot (*Leopardus pardalis*), margay (*L. wiedii*) and tigrina (*L. tigrinus*). *Theriogenology*, 57(8), 2027-2041.
- Morato, R. G. (1997). *Reprodução em onça-pintada Panthera onca (Linnaeus, 1758): avaliação do método para contenção e para obtenção de sêmen, caracterização do ejaculado, biometria testicular, níveis séricos de testosterona e sazonalidade*. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Murray, J. L., & Gardener, G. L. (1997). *Leopardus pardalis*. *Mammalian Species*, 548, 1-10.
- Oliveira, T. G., & Cassaro, K. (1999). *Guia de identificação de felinos brasileiros* (2a ed.). São Paulo: Sociedade de Zoológicos.
- Pineda, M. H., Dooley, M. P., & Martin, P. A. (1984). Long-term study on the effects of electroejaculation on seminal characteristics of the domestic cat. *Am J Vet Res*, 45(5), 1038-1041.
- Pukazhenth, B., Wildt, D. E., & Howard, J. G. (2001). The phenomenon and significance of teratospermia in felids. *Journal of Reproduction and Fertility*, 57, 423-433.
- 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 de Mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- 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*). *Journal of Reproduction and Fertility*, 106, 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 Biol*, 22, 421-441.

Wieloch, D. R., Veado, B. V., & Furtado, D. B. (1997). *Cadernos da Fundação Zoológica Botânica I - Animais do Zoológico* (pp.165-166). Belo Horizonte: Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte: Serviço de educação ambiental.

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*, 29, 1019-1025.

Ximenez, A. (1982). Notes on neotropical felids IX: *Felis (Leopardus) pardalis mitis*. *Comm. Zool. Mus. Hist. Nat. Montevideo*, 12(168), 1-7.

5. ARTIGO II

CARACTERÍSTICAS SEMINAIS E CONGELABILIDADE DE SÊMEN DE JAGUATIRICAS (*Leopardus pardalis* Linnaeus, 1758) ADULTAS, MANTIDAS EM CATIVEIRO, UTILIZANDO DOIS CRIOPROTETORES

RESUMO

O presente trabalho apresentou um estudo da caracterização do ejaculado de seis jaguatiricas adultas de cativeiro e um estudo comparativo entre dois crioprotetores na congelabilidade do sêmen em dois destes animais. A coleta do sêmen foi feita por eletroejaculação (80 estímulos elétricos em 3 séries de 2 a 6V) realizada com o esvaziamento e lavagem prévios da bexiga para se evitar a contaminação do sêmen pela urina. Foram realizadas três coletas de cada animal. A caracterização do ejaculado baseou-se na avaliação do sêmen quanto ao aspecto, a motilidade espermática progressiva, o vigor espermático, a concentração espermática por mL, o total de espermatozóides por ejaculado, o índice espermático e a análise morfológica do sêmen. Os parâmetros avaliados mostraram-se compatíveis aos padrões seminais de felinos estudados, destacando-se os valores médios de espermatozóides totais por ejaculado (37,1 milhões), índice espermático (83%), número total de patologias (35,9%) e patologias maiores (8,9%) e menores e (27,7%). O estudo da congelabilidade avaliou os meios crioprotetores à base de glicerol e etileno glicol, ambos a uma concentração de 6%, na viabilidade do sêmen pós-descongelamento de dois animais. Para isso, foram realizados testes de Termorresistência (TTR), Hiposmótico (HO) e Coloração Supravital (CS). No presente estudo, o meio a base de glicerol se apresentou melhor no teste TTR (45 a 60min glicerol contra 35 a 40min etileno glicol), e os testes HO e SC tiveram uma percentagem de 34% a 43% de células com integridade de membrana e

entre 20% e 68% de células viáveis no pós-descongelamento em ambos os protocolos testados, sendo viáveis para o uso.

Palavras-chave: Jaguatirica, Morfologia, Sêmen, Congelabilidade, Crioprotetores

SEMINAL CHARACTERISTICS AND FREEZEABILITY OF ADULT CAPTIVE OCELOT'S (*Leopardus pardalis* Linnaeus, 1758) SEMEN, USING TWO CRYOPROTECTORS.

ABSTRACT

The present work presented a study of the characterization of the ejaculate of six adult ocelots of captivity and a comparative study between two cryoprotectors in the freezeability of the semen in two of these animals. The collection of the semen was made by electroejaculation (80 electric stimuli in 3 series of 2 to 6v) carried through with the previous emptying and washing of the bladder to prevent the contamination of the semen for urine. Three collections of each animal had been carried through. The characterization of the ejaculate one was based evaluation of the semen's color, consistency, gradual sperm motility, the sperm progressive status, the sperm concentration, the total of sperm for ejaculate, the sperm index and of the morphologic analysis of the semen. The surveyed parameters had been all fellow creatures to the data of literature, being distinguished total the average values of ejaculate spermatozoon for (37,1 million), sperm index (83%), total number of pathology (35.9%) and primary (8.9%) and secondary pathology (27.7%). The freezeability study evaluated the half cryoprotectors to the base of glycerol and ethylene glycol, both to a 6% concentration, in the viability of the semen after unfreeze of two animals. For this, tests of Thermoresistance (TTR), Hiposmotic (HO) and Supravital Coloration (CS) had been carried through. In the present study, the media with the base of glycerol presented best results in the TTR test (45 to 60min glycerol against 35 to 40min ethylene glycol), and tests HO and SC had a percentage of 34% to 43% of cells with integrity of membrane and between 20% and 68% of viable cells in the after-unfreeze in both tested protocols.

Keywords: Ocelot, Morfology, Semen, Freezeability, Cryoprotectors

1. INTRODUÇÃO

A crescente degradação ambiental provocada pelos desmatamentos, construções de barragens, acidentes como derramamento de produtos químicos e queimadas têm como consequência direta a redução e a fragmentação dos inúmeros ecossistemas, levando uma grande diversidade de espécies a sofrer rápido declínio em seu número com consequente perda da diversidade genética (Guimarães, 2002). Os felinos silvestres estão entre as espécies mais ameaçadas do mundo, sendo afetados por fatores que variam geograficamente, seja pela descaracterização de habitats, exigências alimentares, forte pressão de caça (em função do alegado prejuízo que causam ao predarem criações domésticas), além da baixa densidade natural (International Union for Nature Conservation [IUCN], 1996).

A família Felidae é um dos grupos com maior diversidade dentre os carnívoros e inclui espécies que variam em tamanho desde 1kg até mais de 230kg (Emmons, 1988). Os felinos são exclusivamente carnívoros e representam os maiores predadores das florestas tropicais. São tidos, portanto, como “espécie-chave”, influenciando diretamente nas populações de suas presas e indiretamente nas populações animais e vegetais relacionadas a estas (Miller & Rabinowitz, 2002).

Segundo Cubas, Z. S., Silva, J. C. R. & Catão-Dias, J. L. (2006), no Brasil ocorrem oito dessas espécies, entre felinos de grande, médio e pequeno porte. São elas: a onça-pintada (*Panthera onca*), a onça-parda (*Puma concolor*), a jaguatirica (*Leopardus pardalis*), o gato-maracajá (*Leopardus wiedi*), o gato-do-mato-grande (*Leopardus geoffroyi*), o gato-palheiro (*Leopardus colocolo*), o gato-mourisco (*Puma yagouaroundi*) e o gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*). De acordo com a lista oficial de espécies ameaçadas (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis [IBAMA], 2003), todas essas espécies apresentam algum grau de ameaça de extinção, sendo que estão classificadas pela Convenção para o Comércio Internacional de Espécies Ameaçadas da Fauna e Flora Selvagem (CITES, 2008) como grau I ou II de ameaça.

A jaguatirica é a única espécie de felino neotropical pertencente à categoria médio porte, que engloba espécies com o peso do adulto variando entre 7 e 20kg (IUCN, 1996). Mede de 50 cm a 1 m de comprimento (além da cauda, que pode medir até 45 cm) (Wieloch, D. R., Veado, B. V. & Furtado, D. B., 1997). Apresenta hábitos diurnos e noturnos, e se alimenta de pequenos mamíferos, lagartos, aves e ovos (Ximenez, 1982; Bisbal, 1986; Emmons, 1987, 1988; Farrel, L. E., Roman, J. &

Sunquist, M. E., 2000; Bianchi, 2001; Cubas et al., 2006). Ocorre em todo o Continente Americano do sul do Texas ao norte da Argentina (Murray & Gardner, 1997). No Brasil, ocorre em florestas úmidas, cerrado, campos e caatinga. É encontrada em todas as regiões do Brasil, exceto no sul do Rio Grande do Sul (Oliveira & Cassaro, 1999; Cubas et al., 2006).

Devido a isto, nos últimos dez anos a conservação desta espécie tem sido foco da pesquisa em reprodução e de programas de treinamento voltados para as Américas, principalmente Brasil, México e Estados Unidos (Swanson & Brown, 2004). A utilização de biotecnologias reprodutivas visa principalmente a manutenção da variabilidade genética nas populações em cativeiro e em vida livre, além da proliferação desses animais. Tais tecnologias, em especial a coleta e criopreservação de sêmen, permitem a translocação apenas do material genético entre populações de vida livre isoladas e entre populações de vida livre e animais em cativeiro (Swanson, 1998). Para o uso efetivo destas tecnologias nas espécies de felídeos, o estudo e a propagação do conhecimento básico e de novas tecnologias são necessários, pois há variações espécie-específicas que precisam ser consideradas no desenvolvimento destes protocolos (Swanson & Brown, 2004). Dentre os conhecimentos básicos requeridos na formatação de protocolos em reprodução, a morfologia espermática é um parâmetro de avaliação *in vitro* de fácil acesso e de grande importância, uma vez que está intimamente correlacionado com casos de infertilidade (Oettle, 1993). Caracteriza-se a condição de teratospermia quando a percentagem de espermatozoides pleiomórficos apresenta-se em mais de 60% dos espermatozoides presentes no ejaculado, e normospermia como uma percentagem maior que 40% de espermatozoides normais presentes no ejaculado (Neubauer, K., Jewgenow, K., Blottner, S., Wildt, D. E. & Pukazhenth, B. S., 2004; Pukazhenth, B., Wildt, D. E. & Howard, J. G., 2001). A teratospermia frequentemente está presente em felídeos, incluindo certos gatos domésticos, mas os mecanismos celulares e moleculares que provocam este fenômeno são desconhecidos (Neubauer et al., 2004).

Atualmente existem várias descrições de protocolos de criopreservação de sêmen em gato doméstico (Lengwinat & Blottner, 1994; Axner & Linde-Forsberg, 2002; Luvoni, G. C., Kalchschmidt, E., Leoni, S. & Ruggiero, C., 2003; Zambelli, D., Caneppele, B., Castagnetti, C. & Belluzzi, S., 2002) e em felídeos selvagens (Howard, 1993; Swanson et al., 1996; Pukazhenth et al., 2001). Em jaguatirica, foi relatado congelamento de sêmen por Swanson et al. (1996), Morais (2001), Swanson (2003), Tebet (2004) e Baudi (2005).

Protocolos de criopreservação expõem as células espermáticas a inúmeras situações de estresse como: as variações e exposição a temperaturas não fisiológicas, estresse osmótico pelos elevados gradientes de concentração de solutos do meio diluidor de congelamento e pela formação e dissolução de cristais de gelo nos meios intra e extracelular, os quais comprometem sua viabilidade (Watson & Martin, 2000). Para minimizar os efeitos estressantes do congelamento, algumas substâncias crioprotetoras são adicionadas ao sêmen, promovendo alterações das propriedades físicas da solução. Estes agentes crioprotetores podem penetrar ou não através da membrana plasmática, dependendo do seu peso molecular (Amann & Pickett, 1987). Alguns crioprotetores já testados são o glicerol, etileno glicol, propilenoglicol, dimetilformamida, dodecil sulfato de sódio e dimetil sulfóxido (Niemann, 1991; Watson, 1995; Tebet, 2004). O crioprotetor de escolha para espermatozóides em procedimento envolvendo animais de produção é o glicerol (Watson, 1990), porém, embora o glicerol mostre-se extremamente eficiente como crioprotetor intracelular, sabe-se que ele apresenta efeito tóxico sobre o metabolismo celular em determinadas concentrações e temperaturas (Fahy, 1986; England, 1993; Santos, I. W., Lima, V. F. M. H., Nisfeld, L. C. & Ribeiro, A. P. C., 2003). O etileno glicol é um agente crioprotetor mais recentemente testado, apresentando resultados promissores para o congelamento de sêmen em animais domésticos (Dobrinsky, 2002; Oliveira et al., 2006).

Um diluente ideal para 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 (Luvoni et al., 2003). A longevidade espermática *in vitro* pode ser avaliada pela incubação do sêmen, em temperatura corporal no intuito de mimetizar as condições encontradas nos órgãos genitais da fêmea (Teste de Termorresistência). Durante o teste de termorresistência, o sêmen descongelado é incubado em temperaturas que variam de 37 a 39°C, por períodos de até seis horas, durante o qual se avalia a movimentação espermática (Fontbonne & Badinand, 1993; Peña, A. I., Barrio, F., Quintela, L. A. & Herradón, P. G., 1998). As membranas acrossômicas e celulares são facilmente prejudicadas durante o congelamento e descongelamento. Portanto, a avaliação do estado acrossômico e da membrana celular é um importante critério para a determinação das habilidades crioprotetoras dos vários diluentes e métodos de congelamento (Howard, 1993). Watson & Martin (2000) demonstraram que as causas da redução da fertilidade com a utilização de sêmen congelado são a mudança de temperatura, o estresse criopreservativo e a

formação e dissolução de cristais de gelo. Concluiu-se com isso, que são inúmeros os efeitos da criopreservação que causam danos letais ou diminuem a função dos espermatozoides. E estudos da fisiologia dessas células e desenvolvimento das técnicas de criopreservação têm muito a contribuir para a preservação das espécies futuras.

O presente trabalho teve como objetivo descrever os parâmetros morfológicos do sêmen de jaguatiricas adultas mantidas em cativeiro. Objetivou-se, ainda, uma avaliação comparativa da viabilidade de sêmen utilizando dois diferentes crioprotetores no meio diluidor (Tris-citrato com glicerol 6%, e Tris-citrato com etileno glicol 6%) para congelamento de sêmen de jaguatiricas adultas mantidas em sistema de cativeiro.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Para este experimento, foram utilizadas seis jaguatiricas (*Leopardus pardalis*) macho adultas de cativeiro, duas mantidas em Criadouro Conservacionista credenciado no Município de Belo Horizonte, MG, (denominadas Jaguatirica 1 e Jaguatirica 2), duas no Centro de Triagem de Animais Silvestres da UFV (denominadas Jaguatirica 3 e Jaguatirica 4) e duas na Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte (denominadas Jaguatirica 5 e Jaguatirica 6). Os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, registro 50/2008, e pelo IBAMA, registro número 18675-1.

Após 12h de jejum, os animais foram contidos com anestesia dissociativa pela associação dos cloridratos de quetamina e xilazina nas doses de 10 mg/kg e 2 mg/kg, respectivamente, por via intramuscular, por meio de dardos anestésicos, para realização de coleta de sêmen por eletroejaculação. Foi administrado sulfato de atropina na dose de 0,044 mg/kg por via subcutânea para manutenção da normalidade da função cardíaca. Os animais tiveram seus parâmetros vitais aferidos e avaliados por um médico veterinário durante e após o procedimento, sendo monitorados a cada 15 minutos até que conseguissem manter-se em estação, garantindo uma recuperação pós-anestésica segura.

Por meio de uma sonda uretral n°6 acoplada a uma seringa de 10 mL, a bexiga de cada animal foi esvaziada e lavada com solução fisiológica estéril, para evitar qualquer tipo de contaminação do sêmen pela urina.

Os procedimentos de coleta de sêmen foram realizados por meio de um aparelho eletroejaculador acoplado a uma probe retal de 9 cm de perímetro, provida de três

eletrodos longitudinais. A probe foi devidamente lubrificada e introduzida no reto com os eletrodos longitudinais posicionados ventralmente. O pênis foi exposto e acoplado a um ependorff® previamente aquecido a temperatura de 38°C, sendo trocado a cada série de estímulos.

Foi utilizado o protocolo de eletroejaculação preconizado por Wildt, D. E., Bush, M. & O'Brien, S. J. (1993), o qual constou da aplicação de 80 estímulos elétricos variando de 2 a 6V aplicados em três séries de 30, 30 e 20 estímulos. Cada estímulo foi aplicado de forma a demorar aproximadamente 1s para ir de 0V à voltagem desejada, permanecendo por 2s a 3s, seguido por um retorno abrupto a 0V, o intervalo entre os estímulos foi de 2s a 3s. A primeira série consistiu em 10 estímulos de 2V, 10 de 3V e, finalmente, 10 de 4V. O intervalo entre as séries foi de 2 a 3min. A segunda série consistiu de 10 estímulos a 3V, 10 estímulos a 4V e, finalmente, 10 a 5V. Após novo intervalo, de aproximadamente 2 a 3min, foi realizada a última série que consistiu de 10 estímulos de 5V seguidos por 10 de 6V.

Logo após coletados, os ejaculados foram analisados de acordo com os aspectos físicos (cor e aparência). Para auxiliar na aferição do volume, o ejaculado foi coletado em tubo graduado, e logo após utilizou-se uma micropipeta de volume ajustável para a obtenção precisa do volume do ejaculado. Imediatamente após esta análise, a amostra foi pré-diluída na proporção 1:1 em meio base Tris citrato (tabela 1), posteriormente, uma gota do material foi colocada em uma lâmina e esta coberta com lamínula, ambos previamente aquecidos a 38° C a fim de evitar choque térmico. Em seguida, sob um aumento de 100x ao microscópio de luz monocular portátil (A.I. Handycop®), o material foi avaliado quanto à motilidade espermática progressiva (percentual de espermatozóides com movimento progressivo) e ao vigor (força do movimento), este numa escala de zero a cinco. Estes valores foram utilizados no cálculo do índice espermático ($IE = [M + (V \times 20)] / 2$, em que M representa a motilidade e V o vigor espermático), que consiste na média entre vigor e motilidade na qual ambos têm a mesma significância.

Tabela 1: Componentes do meio base para diluição do sêmen.

<i>Componentes</i>	<i>Quantidade</i>
TRIS (g)	3,025
Ácido cítrico (g)	1,70
Frutose (g)	1,25
Gema de ovo (mL)	20
Estreptomicina (mg/L)	1
Água destilada q.s.p (mL)	100

Para a determinação da concentração espermática do ejaculado, utilizou-se uma lâmina especial contendo uma câmara de 10^{-6} mL, fornecida pelo fabricante do microscópio portátil (A.I. Handycope[®]). Depois de avaliados os parâmetros de vigor e motilidade, como descrito anteriormente, aguardou-se um tempo para que os espermatozóides morressem para a contagem dos mesmos na área determinada. A concentração da solução equivale à quantidade de espermatozóides contabilizados multiplicado por 10^6 .

A morfologia espermática foi avaliada a partir de uma fração do sêmen colocada em formol salino tamponado e observada em microscópio de contraste de fase (aumento de 1000x), sendo computadas 200 células de cada coleta. Foram avaliadas em separado duas amostras de cada animal, sendo descritos os valores médios para a presença das formas patológicas. Foram considerados os defeitos maiores: patologia de acrossoma, contorno anormal, patologias de peça intermediária, cauda fortemente enrolada, inserção de cauda oblíqua, gota citoplasmática proximal, cauda fortemente dobrada e subdesenvolvido; e os defeitos menores: cabeça isolada normal, pequeno anormal, cabeça delgada, cauda enrolada, cauda dobrada, cauda dobrada com gota citoplasmática distal e gota citoplasmática distal, de acordo com o Manual do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (Colégio Brasileiro de Reprodução Animal [CBRA], 1998).

Em dois animais do presente estudo foi testada a congelabilidade entre dois crioprotectores: glicerol e etileno glicol em meio base Tris Citrato, ambos na concentração de 6%. Para isso, após a pré-diluição em meio base e avaliação espermática, a amostra foi dividida em duas alíquotas de volume igual e cada uma rediluída em meios contendo 12% de glicerol e 12% de etileno glicol na proporção 1:1, obtendo-se um concentração final de 6% em ambos os meios. As amostras foram envasadas em palhetas de 0,25 mL.

Para se obter uma taxa de resfriamento de $4^{\circ}\text{C}/\text{min.}$, utilizou-se uma caixa de isopor de 12 L com mistura de água em temperatura ambiente e gelo. Foi colocada no isopor uma camada de 11 cm de altura de gelo e posteriormente completou-se com água para esta mesma altura. As palhetas foram então colocadas em um frasco de vidro com tampa contendo água a 38°C , sob a proteção de um tubo de ensaio para que as mesmas não molhassem. Este conjunto foi colocado na caixa de isopor onde permaneceu por duas horas (uma hora de resfriamento e mais uma hora de equilíbrio).

Para o congelamento utilizou-se outro recipiente de isopor, com nitrogênio líquido a uma altura de aproximadamente três centímetros da caixa. Uma bóia de isopor foi colocada sobre essa lâmina de nitrogênio líquido e as palhetas colocadas sobre a

bóia, de forma a ficarem a uma altura de 10 cm, e assim congelarem sob o vapor do nitrogênio. Dessa forma obteve-se uma curva de congelamento de $-5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Passados 15 minutos, as palhetas foram imersas diretamente no nitrogênio líquido e armazenadas em botijão apropriado para posterior avaliação. As curvas de resfriamento e congelamento foram mensuradas com a ajuda de um termômetro digital.

O descongelamento foi realizado inserindo as palhetas em banho-maria à 38°C por um minuto. As palhetas então eram cortadas e o conteúdo transferido para um ependorff® e mantido nesta temperatura. Com a ajuda de uma micropipeta, uma amostra do sêmen descongelado foi colocada em uma câmara de Neubauer para realização do Teste de Termoresistência (TTR). Essa câmara foi mantida em ambiente úmido aquecido a 38°C e avaliado a cada 5 minutos quanto ao vigor e motilidade espermáticos.

Com uma micropipeta de volume ajustável, foram coletados $10\mu\text{L}$ do sêmen diluído, adicionado a $250\mu\text{L}$ de solução de frutose e citrato de sódio a 60 miliosmol. O material foi incubado em banho-maria por 30 minutos e após esse período foram adicionados $250\mu\text{L}$ de formol salino tamponado. Em seguida, 100 células foram observadas em microscopia ótica com 400 vezes de aumento para contabilização do percentual bruto de espermatozóides com cauda enrolada, ou seja, reativos ao teste hiposmótico, que indicam integridade da membrana espermática. Dentro desse total bruto, uma parcela dos espermatozóides já apresentava cauda enrolada mesmo antes do teste hiposmótico, assim, o valor bruto de espermatozóides com cauda enrolada foi corrigido excluindo-se da população total a parcela com caudas enrolada contabilizada antes do teste hiposmótico.

A viabilidade da membrana espermática foi aferida através do teste de coloração supravital, para tal, uma parte de sêmen foi adicionada a duas de corante eosina-nigrosina previamente aquecidas por 40 segundos. Em seguida foi confeccionado um esfregaço em lâmina e imediatamente seco ao ar e observado em aumento de 400x para contabilização de 100 células. Os espermatozóides corados foram computados, sendo considerados lesionados.

Os dados foram apresentados como média, desvio-padrão e coeficiente de variação, a partir da função estatística do programa Microsoft Office Excel® (2003).

3. RESULTADOS

O volume médio obtido nos animais coletados foi de 0,2 mL, com uma concentração média de 134,0 milhões de espermatozóides por mililitro de sêmen, perfazendo uma média de 37,1 milhões de espermatozóide totais ejaculados (tabela 2). Observa-se, ainda na tabela 2, que a motilidade espermática, o vigor e o índice espermático médios foram respectivamente 79,3%, 4,3 e 83%.

Tabela 2: Valores médios, desvios padrão e coeficientes de variação dos parâmetros avaliados na coleta de sêmen em seis jaguatiricas adultas mantidas em cativeiro.

<i>Animal</i> <i>Parâmetros</i> <i>aferidos</i>	<i>J1</i> <i>(n=3)</i>	<i>J2</i> <i>(n=3)</i>	<i>J3</i> <i>(n=3)</i>	<i>J4</i> <i>(n=3)</i>	<i>J5</i> <i>(n=3)</i>	<i>J6</i> <i>(n=3)</i>	<i>Média ± DP</i> <i>(CV)</i>
Voltagem de coleta	4v, 6v	5v, 6v	5v, 6v	4v, 6v	6v, 7v	5v, 6v	-----
Aspecto	Turvo/ Leitoso	Leitoso	Turvo/ Leitoso	Turvo/ Leitoso	Leitoso	Leitoso	-----
Volume espermático (mL)	0,1	0,1	0,3	0,3	0,28	0,22	0,2 ± 0,1 (5)
Concentração Espermática (x10⁶)	28,8	20,5	430	170	58	97	134,0 ± 154,9 (114,9)
Total de espermatozóides/ ejaculado (x10⁶)	2,88	2,05	129	51	16,2	21,3	37,1 ± 48,4 (130,4)
Motilidade espermática (%)	90	85	71	80	80	70	79,3 ± 7,7 (9,7)
Vigor (0-5)	4,5	4,5	4,5	4,0	4,0	4,5	4,3 ± 0,2 (4,7)
Índice espermático	90	87,5	80,5	80	80	80	83,0 ± 4,5 (5,4)

Nota: J = Jaguatirica; n = Número de coletas; DP = Desvio padrão; CV = Coeficiente de variação. ($p > 0.05$).

Os resultados para a morfologia do sêmen de seis jaguatiricas adultas estão sumariados na tabela 3, onde observa-se que em média 35,9% dos espermatozóides apresentam-se pleiomórficos, sendo as condições mais observadas cauda dobrada (11,91%) e cauda enrolada (7,25%). As condições menos observadas foram a presença de patologias de acrossoma (0,3%) e inserção de cauda oblíqua (0,05%). Algumas formas são visualizadas na figura 1.

Tabela 3: Formas morfológicas patológicas e normais do sêmen de jaguatiricas adultas mantidas em cativeiro.

		J1	J2	J3	J4	J5	J6	Média±DP (CV)
NORMAIS (%):		55,50	43,75	73,75	81,75	85,50	44,00	64,04 ± 18,7 (29,2)
PATOLOGIA (%):		44,50	56,25	26,25	18,25	14,50	56,00	35,9 ± 18,7 (55,7)
Patologias de Acrossoma (%)	M A I O R E S	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,0	0,3 ± 0,8 (266,6)
Contorno Anormal (%)		2,25	0,0	1,0	0,5	0,0	4,0	1,29 ± 1,5 (116,3)
Patologia de PI (%)		3,5	8,25	9,25	2,25	0,75	2,0	4,33 ± 3,5 (80,8)
Cauda fortemente enrolada (%)		4,0	2,0	1,0	0,0	0,0	0,0	1,16 ± 1,6 (137,9)
Inserção de cauda Oblíqua (%)		0,0	0,0	0,0	0,25	0,0	0,0	0,05 ± 0,1 (200)
Gota Citoplasmática Proximal (%)		1,5	0,0	0,25	0,0	0,0	2,0	0,62 ± 0,8 (129,0)
Cauda fortemente dobrada (%)		2,0	1,25	0,0	1,0	0,5	0,0	0,79 ± 0,7 (80,6)
Subdesenvolvido (%)		2,0	0,0	0,25	0,0	0,0	0,0	0,37 ± 0,8 (216,2)
TOTAL MAIORES		15,25	11,5	11,75	4,0	1,25	10,0	8,9 ± 5,3 (59,5)
Pequeno anormal (%)	M E N O R E S	4,75	10,75	0,0	0,0	0,0	1,0	2,75 ± 4,3 (156,4)
Cabeça delgada (%)		0,0	0,0	0,0	1,75	0,0	0,0	0,35 ± 0,7 (200)
Cabeça isolada normal (%)		3,0	2,5	2,25	2,75	1,0	4,0	2,58 ± 0,9 (34,8)
Cauda enrolada (%)		15,0	25,0	1,5	2,0	0,0	0,0	7,25 ± 10,4 (143,4)
Cauda dobrada (%)		2,5	0,0	10,25	7,25	11,5	40,0	11,91 ± 14,4 (120,9)
Cauda dobrada com GCD (%)		4,0	6,5	0,25	0,0	0,25	0,0	1,83 ± 2,7 (147,5)
Gota Citoplasmática Distal (%)		0,0	0,0	0,25	0,5	0,5	1,0	0,37 ± 0,3 (81,0)
TOTAL MENORES		29,25	44,75	14,5	14,25	17,75	46,0	27,7 ± 14,7 (53,0)

Nota: J = Jaguatirica; DP = Desvio padrão; CV = Coeficiente de variação; PI = Peça intermediária; GCD = gota citoplasmática distal. ($p > 0,05$).



Figura 1: a) Espermatozóide normal; b) Cauda fortemente dobrada; c) Patologia de Peça intermediária; observadas em microscópio de contraste de fase 1000x.

No estudo da congelabilidade do sêmen de jaguatiricas em dois diferentes crioprotetores, observou-se que ao descongelamento das amostras, as porcentagens de células com integridade das membranas espermáticas apresentaram resultados semelhantes com o uso do etileno glicol e do glicerol (tabela 4). As porcentagens de células apresentando perda de viabilidade das membranas espermáticas apresentaram-se consideravelmente maiores nas amostras testadas com etileno glicol em relação àquelas com glicerol (tabela 4). Na tabela 4 estão descritos os índices espermáticos mensurados a cada cinco minutos, pós descongelamento, das amostras previamente congeladas em ambos os crioprotetores testados. Observa-se que as amostras provenientes do animal Jaguatirica 1 mostraram-se mais eficientes, em especial com o uso do glicerol.

Tabela 4: Teste hiposmótico, coloração supravital e índice espermático para termorresistência realizados no sêmen descongelado de duas jaguatiricas adultas de cativeiro após congelamento em dois diferentes crioprotetores.

<i>Testes realizados</i>	<i>Jaguatirica 1</i>		<i>Jaguatirica 2</i>	
	Glicerol	Etileno glicol	Glicerol	Etileno glicol
Hiposmótico (%)	43	37	40	34
Coloração supravital (%)	59,3	73,5	32,5	80,0
TTR	IE (%)	IE (%)	IE (%)	IE (%)
T0	60	60	50	40
T5	60	55	50	35
T10	60	40	30	25
T15	45	25	25	22
T20	40	21	25	17
T25	30	21	16	11
T30	21	11	16	11
T35	21	11	11	0
T40	21	0	11	0
T45	21	0	0	0
T50	16	0	0	0
T55	11	0	0	0
T60	0	0	0	0

Nota: TTR = Teste de Termorresistência; IE = Índice Espermático; T = Tempo em minutos.

4. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que os valores médios avaliados do sêmen à fresco coletado foram semelhantes aos estudos anteriores, apenas diferindo em correlação à contaminação do sêmen por urina, o que não ocorreu no presente estudo em função da lavagem da bexiga. Moraes et al. (2002) descreveram frações de volume espermático médias de 1,4 mL; Queiroz (2003) descreveu uma média de 0,4 mL; Howard (1993), 0,3 mL; Swanson et al. (2003), 0,6 mL; Baudi (2005), 0,66 mL; e nossos resultados apresentaram 0,2 mL.

Dados registrados na literatura mostram uma amplitude de 28×10^6 e $8,4 \times 10^6$ a um máximo de $283,4 \times 10^6$ e $57,8 \times 10^6$ de concentração de sptz/mL e número total de sptz no volume espermático, respectivamente (Howard, 1993; Queiroz, 2003). O índice espermático (avaliação média entre vigor e motilidade do sêmen) registrado no presente

estudo (83%) mostrou-se ligeiramente maior do que os valores de 70,7% a 77,6% (Swanson et al., 2003; Morais et al., 2002), respectivamente.

No presente experimento, a média de espermatozóides pleiomórficos em jaguatiricas de cativeiro foi de 35,9%, não sendo observado nenhum indivíduo teratospérmico. Valores semelhantes aos apresentados por Queiroz (2003), que relatou na mesma espécie média de 38,6% de defeitos totais. Swanson et al. (1996, 2003) descreveram também em jaguatiricas criadas em cativeiro de 23% a 50% de patologias espermáticas totais com média de 40,2%. Morais et al. (2002) descreveram uma média de 18,7% de defeitos espermáticos totais em 42 jaguatiricas, no entanto, Baudi (2005) relata uma média de 23% e Howard (1993) uma média de 19,2% de formas patológicas em sêmen nessa mesma espécie, sendo inferiores ao do presente estudo.

Nos seis animais avaliados no presente estudo, as patologias mais observadas nos espermatozóides foram cauda dobrada (11,91%) e cauda enrolada (7,25%); as formas patológicas menos observadas foram as patologias de acrossoma (0,3%) e inserção de cauda oblíqua (0,05%). De forma semelhante, Queiroz (2003) relata que os maiores achados patológicos no sêmen de jaguatirica também foram cauda dobrada (10,9%) e cauda fortemente enrolada (4,9%). Morais et al. (2002) descreveram como maiores achados, peça intermediária dobrada com gota citoplasmática (5,7%) e cauda dobrada com gota citoplasmática (2,2), caracterizando elevados índices de anomalias espermáticas no sêmen de jaguatirica.

Nos animais avaliados no presente experimento, observou-se que os espermatozóides com defeitos primários perfizeram uma média de 8,9% e aqueles com defeitos secundários, 27,7%. Morais et al. (2002) relataram cerca de 4% de defeitos primários e 12,7% de defeitos secundários, enquanto Queiroz (2003) descreve 9,5% de defeitos primários e 29,2% de defeitos secundários no sêmen de jaguatiricas adultas em cativeiro.

Após o congelamento do sêmen de felinos observa-se uma forte queda na motilidade espermática, por vezes superior aos 90% (Byers et al., 1989; Donogue, A. M., Johnston, L. A., Munson, L., Brown, J. L. & Wildt, D. E., 1992; Stander-Breedt, H., Schwalbach, L. M. J., Greyling, J. P. C & Loskutoff, N. M., 2004). No presente estudo, observou-se uma queda no índice espermático de 87,5% a 90% no sêmen à fresco para 40% a 60% nas amostras descongeladas, valores similares foram observados por Baudi (2005) com o uso de meio a base de glicerol a 4%, porém inferiores aos observados por Morais (2001), também em jaguatiricas.

No presente estudo, observou-se uma percentagem de 34% a 43% de células com integridade de membrana e entre 20% e 68% de células viáveis no pós-descongelamento em ambos os protocolos testados. Em onças pardas, Deco (2009) registrou que aproximadamente 29% e 25% dos espermatozóides viáveis em amostras congeladas em meio com 5% e 7,5% de glicerol, respectivamente, possuíam as membranas intactas após o procedimento de criopreservação pelo método hiposmótico.

O teste de termorresistência avalia a longevidade espermática e é tido como um bom preditor da fertilidade em várias espécies (England, 1993). Porém a característica de baixa termorresistência, entretanto, não é necessariamente associada à baixa fertilidade, visto que, em alguns estudos, amostras de sêmen com relativo baixo desempenho no teste de termorresistência apresentaram taxas de fertilidade normais (Cardoso, R. C. S., Silva, A. R. & Silva, L. D. M., 2005). No presente estudo, o índice espermático diminuiu progressivamente até a total mortalidade entre 45 e 60 minutos de incubação com o uso do diluente a base de glicerol 6% e entre 35 e 40 minutos com o uso do etileno glicol 6%. Em onças pardas, o índice espermático declinou somente após 20 minutos de incubação para as amostras congeladas em meios com 5% ou 7,5% de glicerol, e passados 80 minutos de incubação todos os espermatozóides morreram (Deco, 2009). Em guepardos, o fator que mais se correlacionou com a penetração e fertilização de ovócitos *in vitro* foi o índice espermático ao longo do tempo, avaliado em amostras frescas de sêmen incubadas a 38°C (Donoghue et al., 1992).

5. CONCLUSÃO

O experimento realizado mostrou resultados médios quantitativos e qualitativos, destacando-se o vigor, a motilidade, e o índice espermático. Quanto à morfologia, os valores médios das patologias totais registradas foram de 35,9%, dentre elas as mais freqüentes foram cauda dobrada (11,91%) e cauda enrolada (7,25%). Foram consideradas médias de 8,9% de defeitos maiores e 27,7% de defeitos menores. Apesar de ter sido realizado em apenas dois animais, o estudo demonstrou melhores resultados no teste de Termorresistência com o meio base contendo o crioprotetor glicerol a 6%, que em até 25 minutos de incubação manteve a qualidade espermática viável para fecundação. Foram avaliadas também porcentagens de 34% a 43% de células com integridade de membrana e entre 20% e 68% de células viáveis no pós-descongelamento em ambos os protocolos testados. O índice espermático caiu de um

valor médio a valores de 40% a 60%. O estudo se mostrou satisfatório na congelabilidade do sêmen de jaguatiricas.

6. BIBLIOGRAFIA³

Amann, R. P., & Pickett, B. W. (1987). Principles of cryopreservation and review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Vet. Sci.*, 7, 143-173.

Axnér, E., & Linde-Forsberg, C. (2002). Semen collection and assessment, and artificial insemination in the cat. In P. W. Concannon, G. England, J. Verstegen & C. Linde-Forsberg, *Recent advances in small animal reproduction*. New York: International Veterinary Information Service.

Baudi, D. L. K. (2005). *Efeito de dois métodos de resfriamento sobre a função espermiática in vitro de sêmen criopreservado de felinos (Leopardus tigrinus, Leopardus pardalis e Felis catus), avaliada através de ensaio competitivo de ligação em ovócitos de gata doméstica (Felis catus)*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil.

Bianchi, R. de C. (2001). *Estudo comparativo da dieta da jaguatirica Leopardus pardalis (Linnaeus, 1758) em Mata Atlântica*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Brasil.

Bisbal, E. (1986). Food habits of some neotropical felids in Venezuela (Mammalia: Carnivora). *Mammalia*, 50(3), 329-339.

Byers, A. P., Hunter, A. G., Seal, U. S., Binkzik, G. A., Graham, E. F., Reindl, N. J. et al. (1989). *In vitro* induction of capacitation of fresh and frozen spermatozoa of the siberian tiger (*Panthera tigris*). *Journal of Reproduction and Fertility*, 86, 599-607.

Cardoso, R. C. S., Silva, A. R., & Silva, L. D. M. (2005). Métodos de avaliação do sêmen canino congelado. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 29(314), 179-187.

Colégio Brasileiro de Reprodução Animal - CBRA. (1998). *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal* (2a ed.). Belo Horizonte, Brasil: Autor.

³ Referências bibliográficas apresentadas segundo as normas da American Psychological Association [APA]. (2001). *Publication manual of the American Psychological Association* (5th ed.). Washington, DC: Author.

- Convenção para o Comércio Internacional de Espécies Ameaçadas da Fauna e Flora Selvagem [CITES]. (2008). *The CITES Appendices*. Recuperado em 12 de dezembro, 2008, de <http://www.cites.org/eng/app/index.shtml>
- Cubas, Z. S., Silva, J. C. R., & Catão-Dias, J. L. (2006). *Tratado de animais selvagens*. São Paulo: Roca.
- Deco, T. S. (2009). *Avaliação andrológica, coleta e criopreservação de sêmen de puma (Puma concolor Linnaeus, 1771)*. Dissertação de Mestrado, Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.
- Dobrinnsky J. R. (2002). Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. *Theriogenology*, 57, 285-302.
- Donoghue, A. M., Johnston, L. A., Munson, L., Brown, J. L., & Wildt, D. E. (1992). Influence of gonadotropin treatment interval on follicular maturation, *in vitro* fertilization, circulating steroid concentrations, and subsequent luteal function in the domestic cat. *Biol Reprod*, 46, 972-980.
- Emmons, L. H. (1987). Comparative feeding ecology of felids in a neotropical rainforest. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 20(4), 271-283.
- Emmons, L. H. (1988). A field study of ocelots (*Felis pardalis*) in Peru. *Rev. Ecol. (Terre Vie)*, 43, 133-157.
- England, G. C. (1993). Cryopreservation of dog semen: a review. *J. Reprod. Fert. Suppl*, 47, 234-255.
- Fahy, G. M. (1986). The relevance of cryoprotectant “toxicity” to cryobiology. *Cryobiology*, 23(1), 1-13.
- Farrell, L. E., Roman, J., & Sunquist, M. E. (2000). Dietary separation of sympatric carnivores identified by molecular analysis of scats. *Molecular Ecology*, 9, 1583-1590.
- Fontbonne, A., & Badinand, F. (1993). Studies on freezing dog spermatozoa: effect of glycerol on motility after thawing. *J. Reprod. Fert. Suppl*, 47, 531-532.
- Guimarães, M. A. B. V. (2002). Biotecnologia aplicada aos animais silvestres: aspectos éticos e conservacionistas. *Revista Brasileira Reprodução Animal*, 26(2), 58-61.

- Howard, J. G. (1993). Semen collection and analysis in nondomestic carnivores. In M. E. Fowler, *Zoo and wild animal medicine* (3rd ed.) (pp.390-399). Philadelphia: W.B. Saunders Co.
- Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis [IBAMA]. (2003). *Lista oficial da fauna brasileira ameaçada de extinção*. Recuperado em 13 de dezembro, 2008, de <http://www.ibama.gov.br>
- International Union for Nature Conservation [IUCN]. (1996). *Status survey and conservation action plan wild cats*. Cambridge: IUCN/SSC Cat Special Group.
- Lengwinat, T., & Blottner, S. (1994). In vitro fertilization of follicular oocytes of domestic cat using fresh and cryopreserved epididymal spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 35, 291-301.
- Luvoni, G. C., Kalchschmidt, E., Leoni, S., & Ruggiero, C. (2003). Review conservation of feline semen part I: cooling and freezing protocols. *J Feline Med Surg*, 5, 203-208.
- Miller, B., & Rabinowitz, A. (2002). Why conserve jaguar? In R. A. Medellin, C. Chietkiewicz, K. H. Redford, J. G. Robinson, E. Anderson & E. A. Taber, *El jaguar en el nuevo milenio*. Mexico: Universidad Nacional Aitonoma de Mexico/ Wildlife Conservation Society.
- Morais, R. N. (2001). Reproduction in small felid males. In M. E. Fowler & Z. S. Cubas, *Biology, medicine and surgery of South American wild animals* (pp.312-316). Iowa: Iowa State University Press.
- Morais, R. N., Mucciolo, R. G., Gomes, M. L. F., Lacerda, O., Moraes, W., Moreira, N. et al. (2002). Seasonal analysis of semen characteristics, serum testosterone and fecal androgens in the ocelot (*Leopardus pardalis*), margay (*L. wiedii*) and tigrina (*L. tigrinus*). *Theriogenology*, 57(8), 2027-2041.
- Murray, J. L., & Gardener, G. L. (1997). *Leopardus pardalis*. *Mammalian Species*, 548, 1-10.
- Neubauer, K., Jewgenow, K., Blottner, S., Wildt, D. E., & Pukazhenth, B. S. (2004). Quantity rather than quality in teratospermic males: a histomorphometric and flow cytometric evaluation of spermatogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). *Biology of Reproduction*, 71(5), 1517-1524.

- Niemann, A. (1991). *Ovulationsbeeinflussung durch intrazervikale infusion spermienfreier oder spermienhaltiger medien bei der jungsau in abhängigkeit vom stimulationszeitpunkt*. Tese de Doutorado, Hannover, Tierärztl, Hochsch.
- Oettle, E. E. (1993). Sperm morphology and fertility in the dog. *J. Reprod. Fertil. Suppl*, 47, 257-260.
- Oliveira, T. G., & Cassaro, K. (1999). *Guia de identificação de felinos brasileiros* (2a ed.). São Paulo: Sociedade de Zoológicos.
- Oliveira, J. V., Alvarenga, M. A., Melo, C. M., Macedo, L. P., Dellaqua Jr., J. A., & Papa, F. O. (2006). Effect of cryoprotectant on donkey sêmen freezability and fertility. *Animal Reproduction Science*, 94, 82-84.
- Peña, A. I., Barrio, F., Quintela, L. A., & Herradón, P. G. (1998). Effects of different glycerol treatments on frozen-thawed dog sperm longevity and acrosomal integrity. *Theriogenology*, 50, 163-174.
- Pukazhenth, B., Wildt, D. E., & Howard, J. G. (2001). The phenomenon and significance of teratospermia in felids. *Journal of Reproduction and Fertility*, 57, 423-433.
- 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 de Mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Santos, I. W., Lima, V. F. M. H., Nisfeld, L. C., & Ribeiro, A. P. C. (2003). Congelação do sêmen canino comparando diferentes concentrações de glicerol e diferentes tempos de equilíbrio. *Archives of Veterinary Science*, 8(2), 57-62.
- Stander-Breedt, H., Schwalbach, L. M. J., Geyling, J. P. C., & Loskutoff, N. M. (2004). Effect of different cryodiluents and thawing methods on the post-thaw motility of african lion (*Panthera leo*) spermatozoa. *South African Journal of Animal Science*, 34(2), 74-76.
- 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*). *Journal of Reproduction and Fertility*, 106, 87-94.

- Swanson, W. F. (1998). Curso de Extensão – felinos selvagens. In *Biotécnicas reprodutivas e conservação* (pp.5-10). Curitiba, PR: Setor de Ciências Biológicas, UFPR.
- 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 Biol*, 22, 421-441.
- Swanson, W. F., & Brown, J. L. (2004). International training programs in reproductive sciences for conservation of Latin American felids. *Animal Reproduction Science*, 82, 21-34.
- 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 de Doutorado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu, SP, Brasil.
- Watson, P. F. (1990). Artificial insemination and preservation of the semen. In *Marshall's physiology of reproduction* (4th ed.) (pp.747-869). Edinburgh: Churchill Livingstone.
- Watson, P. F. (1995). Recent developments and concepts in cryopreservation of sperm and assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.*, 7, 871-892.
- Watson, P. F., & Martin, I. C. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, 60(1), 481-492.
- Wieloch, D. R., Veado, B. V., & Furtado, D. B. (1997). *Cadernos da Fundação Zoo-Botânica I - Animais do Zoológico* (pp.165-166). Belo Horizonte: Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte: Serviço de educação ambiental.
- Wildt, D. E., Bush, M., & O'Brien, S. J. (1993). Training manual: reproduction, genetics and veterinary medicine. *Front Royal: Center for New Opportunities in Animal Health Sciences (NOAHS)*, Conservation and Research Center, National Zoo, Smithsonian Institution.
- Ximenez, A. (1982). Notes on neotropical felids IX: *Felis (Leopardus) pardalis mitis*. *Comm. Zool. Mus. Hist. Nat. Montevideo*, 12(168), 1-7.

Zambelli, D., Caneppele, B., Castagnetti, C., & Belluzzi, S. (2002). Cryopreservation of cat semen in straws: comparison of five different freezing rates. *Reprod. Dom. Anim.*, 37, 310-313.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse trabalho propôs o desenvolvimento e a aplicação de técnicas de reprodução assistida para coleta e avaliação do sêmen de jaguatiricas (*Leopardus pardalis*) macho adultos mantidas em cativeiro, pois mesmo quando *ex situ*, os felinos silvestres são considerados ameaçados de extinção.

O estudo reprodutivo de espécies-chave ameaçadas de extinção vem sendo realizado freqüentemente, e trabalhos que promovam o aprimoramento das técnicas de reprodução assistida são extremamente importantes para a garantia de melhores resultados nesses animais.

O exame andrológico e a criopreservação do sêmen são os principais mecanismos usados para a seleção e conservação do material genético do macho.