

THYARA DE DECO SOUZA

AVALIAÇÃO ANDROLÓGICA E CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE PUMAS (*Puma concolor* LINNAEUS, 1771) ADULTOS.

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2009**

THYARA DE DECO SOUZA

**AVALIAÇÃO ANDROLÓGICA E CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE
PUMAS (*Puma concolor* LINNAEUS, 1771) ADULTOS.**

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

APROVADA: 02 de março de 2009

Prof. Deiler Sampaio Costa

Prof. José Domingos Guimarães
(Coorientador)

Prof. Eduardo Paulino da Costa

Prof. Sergio Luis P. da Matta

Prof. Tarcízio Antônio Rêgo de Paula
(Orientador)

DEDICATÓRIA

Aos meus amados pais Fátima Izabel de Deco Souza e Márcio José de Souza, por terem batalhado pelos meus estudos, por sonharem comigo e pelo amor incondicional. À minha irmã e amiga, Thaiz e ao Gediendson que me apoiaram em cada momento desta caminhada.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela minha vida, por cada pessoa que colocou em minha caminhada, meus pais, irmã e amigos, por permitir que realize meus sonhos e por ter nos dado um mundo com uma natureza tão fascinante.

A meus pais, Márcio José de Souza e Fátima Izabel de Deco Souza, por batalharem diariamente pelos meus estudos, pelo Amor, Carinho e Compreensão. Amo Vocês.

A Thais, minha irmã, pelo companheirismo, amizade e amor pelos animais.

A vó Maria e vô Nelito, vó Ita e vô Totonho, pela sabedoria e amor.

Ao Gediendson, por ser meu porto seguro nas horas difíceis, meu companheiro, dividindo os mesmos sonhos, meu amigo, meu amor.

A todos os meus familiares, tias, tios e primos pelos momentos de alegria e pela amizade.

Ao meu orientador, Tarcizio A. R. de Paula, pelos ensinamentos, amizade verdadeira e por permitir que eu realize meu sonho de ajudar na conservação da fauna brasileira.

As minhas grandes amigas de Vitória, irmãs, Cybelle, Fernanda, Priscila e Cynthia, pela amizade pura e verdadeira, por mesmo a mais de 700 Km de distância estarem sempre ao meu lado.

Aos amigos do CETAS-UFV, Thais, Eduardo, Moacir, Marcos, Carlão, Pamella, Juliano, Tabela Letícia, Leanes, Rafael (Mãozinha) Alice, Filipe (Baiano), Vinícius, Fernadinha, Ayisa, Rodrigo (Gimgim), Carla, Rose, João e Grazi, por todos os momentos de alegria no trabalho (e fora dele!) e por compartilharem a paixão pelos animais silvestres e pelo CETAS-UFV.

A Thais e Dudu pela amizade.

A Priscilla Sarti pelos ensinamentos no CETAS-UFV, por todos os puxões de orelha e madrugadas escrevendo trabalhos e acima de tudo por ter sido uma amiga.

A equipe da Diretoria de Enriquecimento e Condicionamento Thais, Alice, Filipe (Baiano), Vinícius, Fernadinha, Carla e Rose por todas as horas elaborando os melhores

enriquecimentos (nem sempre apreciados pelos animais) e dedicação ao bem estar dos animais no cativeiro.

A equipe da Diretoria de Reabilitação e Soltura por suportarem todos os carrapatos, mosquitos e dias sem um banho nos monitoramentos.

Aos todos estagiários do CETAS-UFV por entenderem a importância da nossa batalha pela preservação da fauna e vestirem esta camisa.

As minhas “mães” e “pais” de viçosa, Sâmara, Camila, Gabriela, Mariliane , Karen, Gabriel, Celso e Renato, por terem sido minha família durante a nossa graduação.

Ao Prof. Deiler pelo convite, hospitalidade e ensinamentos durante as coletas de material para essa dissertação.

Ao CRAS-MS pela oportunidade de coletar o material para esta dissertação em seus animais.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	vii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. PUMA (<i>PUMA CONCOLOR</i> LINNAEUS, 1771)	4
2.2. TECNOLOGIAS DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA E A CONSERVAÇÃO DAS ESPÉCIES	8
2.3. COLETA DE SÊMEN EM FELINOS	10
2.4. AVALIAÇÃO DE SÊMEN	12
2.5. TERATOSPERMIA EM FELINOS	16
2.6. DANOS CELULARES CAUSADOS PELA CRIOPRESERVAÇÃO	19
2.7. CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN EM FELINOS	22
2.8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	24
2.9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
3. AVALIAÇÃO ANDROLÓGICA, COLETA DE SÊMEN E CARACTERIZAÇÃO DO EJACULADO DE PUMA (<i>Puma concolor</i>), MANTIDOS EM CATIVEIRO	40
RESUMO	40
ABSTRACT	41
3.1. INTRODUÇÃO	42
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	44
3.3. RESULTADOS	48
3.4. DISCUSSÃO	52
3.5. CONCLUSÃO	55
3.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

4. CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE PUMA (<i>Puma concolor</i>): COMPARAÇÃO ENTRE DUAS CONCENTRAÇÕES DE GLICEROL NO MEIO DE CONGELAMENTO	61
RESUMO	61
ABSTRACT	62
4.1. INTRODUÇÃO	63
4.2. MATERIAL E MÉTODOS	64
4.3. RESULTADOS	69
4.4. DISCUSSÃO	72
4.5. CONCLUSÃO	75
4.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 3.1 - Procedimento de biometria da área de espículas (A), biometria corporal (B) e testicular (C) em pumas adultos mantidos em cativeiro.

Figura 3.2 - Procedimentos de coleta de urina e lavagem da bexiga realizados em pumas adultos mantidos em condições de cativeiro.

Figura 3.3 - Procedimento de coleta de sêmen em pumas adultos mantidos em condições de cativeiro. Lubrificação da probe (A), posição correta para inserção da probe no reto do animal (B) e aplicação do estímulo (C), observe a extensão dos membros pélvicos durante a aplicação do estímulo (D).

Figura 3.4 - Características das espículas penianas de pumas adultos mantidos em condições de cativeiro.

Figura 4.1 - Curva de resfriamento utilizada para criopreservação de sêmen de pumas adultos mantidos em cativeiro.

Figura 4.2 - Equipamento utilizado para o resfriamento das amostras de sêmen de pumas adultos mantidos em cativeiro.

Figura 4.3 - Curva de congelamento utilizada para criopreservação de sêmen de pumas adultos mantidos em cativeiro.

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Biometria corporal de pumas adultos mantidos em condições de cativeiro.

Tabela 3.2 - Avaliação andrológica de pumas adultos mantidos em condições de cativeiro.

Tabela 3.3 - Características do ejaculado de pumas adultos mantidos em condições de cativeiro.

Tabela 3.4 - Patologias espermáticas observadas em sêmen de pumas adultos mantidos em condições de cativeiro.

Tabela 4.1 - Componentes utilizados no meio para criopreservação de sêmen de puma.

Tabela 4.2 - Avaliação do ejaculado a fresco de pumas adultos mantidos em condições de cativeiro.

Tabela 4.3 - Motilidade de sêmen, a fresco e após o descongelamento, em meios com 5 e 7,5% de glicerol, coletados de pumas adultos mantidos em condições de cativeiro.

Tabela 4.4 - Vigor espermático antes e após o congelamento, em meios com 5 e 7,5% de glicerol, de sêmen de pumas adltos mantidos em condições de cativeiro.

Tabela 4.5 - Índice espermático antes e após o congelamento, em meios com 5 e 7,5% de glicerol, de sêmen de pumas adltos mantidos em condições de cativeiro.

Tabela 4.6 - Índice espermático avaliado a cada 20 minutos de incubação a 38°C do sêmen, de pumas, descongelado diluídos em meio 5 e 7,5% de glicerol. Teste de Termorresistência (TTR).

Tabela 4.7 - Teste hiposmótico após o descongelamento, em meios com 5 e 7,5% de glicerol, de sêmen de pumas adultos mantidos em condições de cativeiro.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APA - Área de Proteção Ambiental

ATP - Adenosina Trifosfato

CBRA - Colégio Brasileiro de Reprodução Animal

CITES - Convention on International Trade in Endangered Species

Coef. Var. - Coeficiente de Variação

Comp. – Autor Compilador

DMSO - Dimetil-Sulfóxido

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

DP - Desvio Padrão

Ed. - Autor Editor

ed. - Edição

FSH - Hormônio Folículo Estimulante

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

IE - Índice Espermático

IGS - Índice Gonadossomático

IM – Intra Muscular

IUCN - Internacional Union For Nature Conservaion

Jan. - Janeiro

LH - Hormônio Luteinizante

M - Motilidade Espermática

PV - Peso Vivo

SC - Subcutâneo

Sptz - Espermatozóde

TES - N-Trishidroximetil-Metil2-Aminometano-Sulfônico

TRIS - Trishidroximetil-Aminometano

UFV - Universidade Federal de Viçosa

v - Volume

vD - Volume do Testículo Direito

vE - Volume do Testículo Esquerdo

Vi - Vigor Espermático

RESUMO

SOUZA, Thyara de Deco, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Março de 2009. **Avaliação andrológica e criopreservação de sêmen de pumas (*Puma concolor* Linnaeus, 1771) adultos.** Orientador: Tarcízio Antônio Rêgo de Paula. Coorientadores: José Domingos Guimarães e Cláudio César Fonseca.

Os felinos silvestres estão entre as espécies mais ameaçadas do mundo, e sua população é afetada por fatores que variam geograficamente, seja a descaracterização de habitats, disponibilidade de alimentos, forte pressão de caça ou baixa densidade populacional. Tecnologias de reprodução assistida, como a criopreservação de gametas e a fertilização *in vitro*, são ferramentas fundamentais para a conservação das espécies, uma vez que auxiliam na manutenção de uma população geneticamente viável e permitem translocação de material genético sem a necessidade do transporte dos animais. O presente estudo objetivou coletar sêmen de pumas (*Puma concolor*) assim como descrever as características físicas e morfológicas do sêmen e também avaliar a congelabilidade do sêmen desta espécie empregando dois meios de congelamento a base de TRIS-citrato e gema de ovo, sendo um com 5% de glicerol e outro com 7,5%. Foram utilizados cinco pumas adultos mantidos em condições de cativeiro no Centro de Reabilitação de Animais Silvestres do estado do Mato Grosso do Sul – Brasil (CRAS-MS). Os animais foram anestesiados com associação de cloridrato de quetamina e cloridrato de xilazina nas doses de 10 mg/kg e 1,2 mg/kg, respectivamente. Posteriormente foi realizada a coleta, por meio da eletroejaculação, que consistiu na aplicação de um máximo de 4 séries de 10 estímulos elétricos de 16V. Após a sedação, procedeu-se a coleta de urina e lavagem da bexiga com solução fisiológica estéril. O sêmen coletado foi analisado quanto ao aspecto físico (cor e odor), volume, concentração e morfologia espermática, além do vigor e da motilidade, que foram utilizados para o cálculo do índice espermático. O sêmen foi envasado em palhetas de 0,25 mL, resfriado sob uma taxa de $-0,55^{\circ}\text{C}/\text{min}$ por duas horas (uma hora de resfriamento e mais uma hora de equilíbrio) e por fim congelado a uma taxa de $-5,8^{\circ}\text{C}/\text{min}$. As amostras de sêmen foram descongeladas em banho maria a 37°C por 30 segundos e avaliadas quanto ao vigor e à motilidade espermática, além dos teste de termorresistência e hiposmótico. O protocolo proposto para coleta de sêmen de puma mantidos em cativeiro mostrou-se eficiente, com a obtenção de amostras livres de contaminação com urina e com uma média total de espermatozoides por ejaculado superior à descrita na literatura para esta espécie. O índice espermático observado nas amostras frescas

também foi superior ao descrito na literatura. A média de patologias totais observada foi de 53,88% e apesar da elevada taxa de espermatozoides patológicos, apenas um indivíduo dentre os pumas avaliados mostrou-se teratospérmico. As patologias mais frequentemente observadas foram cauda fortemente dobrada ou enrolada, cauda dobrada ou enrolada e cauda enrolada na cabeça. O protocolo de congelamento e descongelamento empregado mostrou-se satisfatório na criopreservação de sêmen de puma. O índice espermático declinou somente após 40 minutos de incubação a 38°C em ambos os meios testados (16,25% no meio com 5% de glicerol e 11,25% no meio com 7,5%) e em média de 25 a 29% dos espermatozoides apresentaram integridade na membrana plasmática. Não foram observadas diferenças ($p>0,05$) entre os parâmetros avaliados após a criopreservação, utilizando as diferentes concentrações de glicerol no meio TRIS- gema de ovo.

ABSTRACT

SOUZA, Thyara de Deco, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, March of 2009. **Andrologic evaluation and cryopreservation of adult cougar's (*Puma concolor* Linnaeus, 1771) semen.** Adviser: Tarcízio Antônio Rêgo de Paula. Co-advisers: José Domingos Guimarães and Cláudio César Fonseca.

The wild felines is one of the most endangered species of the world and its population is affected by some factors that vary geographically because of the alteration of their habitat, food available, strong hunt pressure or even the low population density. Assisted reproduction techniques such as gamete's cryopreservation and *in vitro* fertilization are fundamental for the conservation as they contribute to restoring genetic vigor and makes possible to transfer genetics sources without moving the animals itself. The aim of this study is collect semen from cougar (*Puma concolor*), describe its physics and morphologic characteristics and also evaluate its frozen capacity using two extenders with TRIS-citrate and egg yolk were evaluated, one with 5% of glycerol and the other with 7.5%. Five captive adult cougars from Mato Grosso do Sul's Rehabilitation Center – Brazil (CRAS-MS) were used. The anesthetic protocol was an association of ketamine (10 mg/kg) and xilazine (1.2 mg/kg). Semen collection was done through electroejaculation method with a maximum of four series of 10 stimuli with 16 Volts. Before with collection the urine was collected and the bladder was washed with sterile physiologic solution. The semen samples were evaluated using the following parameters: physics aspects (color and smell), volume, concentration, morphology, sperm progressive status, sperm motility. The last two parameters were used to calculate the sperm motility index. The semen samples were packed in 0.25 ml straws, cooled at a rate – 0.55°C/min during two hours (one for de cooling and one in equilibrium) and finely frozen at a rate –5.8°C/min. The thawing was carried through immersion in water at 37°C during 30 seconds. The post thawed samples were evaluated using the sperm progressive status, sperm motility, sperm longevity (thermorresistance test) and hiposmotic swelling tests. The protocol used in this study for captive cougar's semen collection were efficient, with the acquisition of samples free from urine and a medium of total spermatozoids per ejaculate higher than those describe in literature for this species. The sperm motility index was also higher than those describe in literature. The medium of structurally abnormal spermatozoa were 53.88% and besides the high pleiomorphic rate only one animal between those evaluated at this study was considered teratospermic. The most frequent pathologies were tightly coiled or bent tail,

coiled or bent tail and tail coiled on the head. The cryopreservation and thawing protocol were good for the cryopreservation of cougar's semen. The sperm motility index reduced only after 40 minutes of incubation at 38°C for both extenders tested (16.25% in the extender with 5% of glycerol and 11.25% in the extender with 7.5%) and a medium of 25 to 29% of the spermatozooids showed plasmatic membrane integrity. There was no difference ($p>0.05$) between the two concentrations of glycerol used, according to the parameters evaluated.

1. INTRODUÇÃO

A distribuição e abundância dos grandes carnívoros diminuíram drasticamente com o decorrer da ocupação humana (Paquet & Hackman 1995). Alguns destes processos de extinção são naturais, decorrentes da própria evolução das espécies, entretanto, as principais causas da perda da diversidade biológica atualmente são a destruição do habitat, a introdução de espécies exóticas e a predação direta. Os felinos silvestres estão entre as espécies mais ameaçadas do mundo, sendo afetados por fatores que variam localmente, seja pela descaracterização de habitats, disponibilidade de alimentos, forte pressão de caça, além da baixa densidade populacional (IUCN, 1996). Esta é uma situação generalizada para a maioria dos predadores neotropicais, que influenciam na dinâmica de populações e conseqüentemente, no equilíbrio ecológico como um todo (Redford, 1997).

Os pumas (*Puma concolor*) são animais que necessitam de grandes áreas, geralmente maiores que 100 Km² e se dispersam por longas distâncias, até mesmo na presença de grande descontinuidade em seu habitat (Ruth *et al.*, 1998). Weaver *et al.* (1996) estimaram que conflitos com humanos, representam uma taxa significativa da mortalidade de pumas adultos. A pressão da caça e a alteração de seus habitats, com conseqüente redução da disponibilidade de suas presas, são as principais causas de ameaça à sobrevivência dessa espécie (Indrusiak & Eizirik, 2003).

A conservação das espécies está intrinsecamente ligada à manutenção da variabilidade genética. Quando uma população é isolada geograficamente e fica sujeita à uniformidade genética, vários fatores se aliam para desencadear o processo de extinção. Entre estes fatores estão a maior susceptibilidade a doenças, o aumento de anormalidades espermáticas e diminuição da fertilidade, o desbalanceamento endócrino de hormônios reprodutivos afetando a espermatogênese, a ovulação e a morbidade e mortalidade perinatal (O'Brien & McCulloch, 1985; Wildt *et al.*, 1987; Munson *et al.*, 1996; Eizirik *et al.*, 2001).

Estratégias de conservação objetivam manter e, se possível, aumentar a biodiversidade. A ação ideal para se alcançar este objetivo é preservar o hábitat da espécie (Loi *et al.*, 2001). No entanto, estratégias de conservação *in situ* nem sempre são suficientes na propagação de pequenas populações e manutenção de uma adequada variabilidade genética (Comizzoli, *et al.*, 2000). Neste sentido estratégias de conservação *ex situ* objetivam auxiliar na conservação

de uma população geneticamente viável por meio de estratégias de reprodução assistida e criopreservação de fontes genéticas (Andrabi & Maxwell, 2007).

Tecnologias de reprodução assistida como inseminação artificial, fertilização *in vitro* e transferência de embriões vêm sendo cada vez mais aplicadas (Swanson, 1998; Wildt & Roth, 1997). Além da investigação do potencial reprodutivo destes animais, estas tecnologias têm como aplicação a translocação apenas do material genético entre populações de vida livres isoladas e entre populações de vida livres e animais em cativeiro (Wildt & Roth, 1997; Swanson, 1998).

Amostras de sêmen a serem utilizadas em programas de reprodução assistida em felinos podem ser obtidas por meio de vagina artificial (Sojka & Jennings, 1970a; Sojka et al., 1970b; Zambelli & Belluzzi, 1998), eletroejaculação (Platz et al., 1978; Dooley et al., 1983; Johnstone, 1984; Howard et al., 1986) ou coletado diretamente do epidídimo ou vasos deferentes (Howard et al., 1986; Axnér, 1998). A eletroejaculação, que envolve a estimulação dos nervos ligados aos órgãos reprodutores por meio de correntes elétricas fracas, é a técnica mais apropriada para animais silvestres, uma vez que pode ser realizada em animais anestesiados.

O sucesso na criopreservação de espermatozóides do gato doméstico foi apresentado nos anos 70 (Platz et al., 1978). Atualmente existem várias descrições de protocolos de congelamento de sêmen em gato doméstico (Lengwinat & Blottner, 1994; Axnér & Linde-Forsberg, 2002; Zambelli et al., 2002; Luvoni et al., 2003) e em felídeos selvagens (Howard, 1993; Swanson et al., 1996b; Pukazhenthil et al., 2001). Alguns danos causados pela criopreservação podem ser evitados ou pelo menos minimizados pela diluição da amostra em meio adequado para criopreservação. Um diluente ideal para o sêmen de felinos, no entanto, ainda não foi determinado (Luvoni et al., 2003).

Estudos de reprodução animal englobam uma diversidade de áreas que estão inter-relacionadas, incluindo biologia de gametas, embriologia, endocrinologia e criobiologia. Para o uso efetivo de biotecnologias em reprodução assistida 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).

A criopreservação de gametas viáveis de alta qualidade genética é fundamental para a criação de um banco de reserva genômica e importante para a manutenção do potencial

reprodutivo no futuro. O desenvolvimento de protocolos de coleta e congelamento espécie-específico, portanto, é de suma importância para a manutenção de uma reserva genética de populações.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. PUMA (*Puma concolor* LINNAEUS, 1771)

O puma (*Puma concolor*) também conhecido como onça parda, suçuarana, leão baio, maçaroca, lombo preto, ruiva, jaguapita, leão, leão da montanha, leãozinho baio, leão da macega, leãozinho da cara suja, leopardo, onça vermelha (Galvão, 1978), foi primeiramente classificado por Linnaeus em 1771 no gênero *Felis* e, mais recentemente por Wozencraft (1993) em gênero próprio *Puma*. Pelo menos 30 subespécies de *Puma concolor* foram classificadas (Anderson, 1983). Alguns autores indicam a ocorrência de seis subespécies no Brasil: *P. concolor anthonyi* (extremo sul da Venezuela até o Pico da Neblina); *P. concolor concolor* (extremo norte da Amazônia); *P. concolor borbonsis* (restante da Bacia Amazônica); *P. concolor acrocodia* (campos abertos e matas do Pantanal mato-grossense); *P. concolor greeni* (parte do cerrado, caatinga e remanescentes da Mata Atlântica do Nordeste); *P. concolor capricornensis* (Mata Atlântica da região Sudeste estendendo-se para o limite leste do Pantanal, até o extremo Sul do Brasil) (Fonseca, et al., 1994).

As características morfológicas desta espécie são expressões evolucionárias de um carnívoro adaptado para caçar em habitats com variadas topografias e coberturas florísticas. A onça parda possui membros musculosos, sendo os pélvicos mais longos que os torácicos, diferença esta maior que nos demais felinos, possibilitando adaptação para saltos. A cauda pesada e cilíndrica funciona como contrapeso nos saltos (Gonyea, 1976). Em regiões tropicais, a pelagem é curta e eriçada e, em latitudes extremas, apresenta-se mais longa e densa. A coloração da pelagem varia de vermelha a cinza, sendo a primeira predominante em regiões tropicais e a segunda mais encontrada na América Central (Conforti & Azevedo, 2003; Riley et al., 2004).

O puma é a segunda maior espécie de felino do Brasil, perdendo apenas para a onça-pintada (*Panthera onca*). Machos pesam entre 55 e 65 kg enquanto fêmeas pesam entre 35 e 45 kg (Logan & Swenor, 2001). A onça parda possui ampla distribuição latitudinal abrangendo diversos habitats, desde o Canadá até o Chile, incluindo o Brasil (Redford & Eisenberg, 1992; Emmons & Feer, 1997). No Brasil, esta espécie pode ser encontrada em todos os biomas (Amazônia, Cerrado, Caatinga, Pantanal, Mata Atlântica e Campos Sulinos) e possui adaptação a diversos climas e ambientes, tanto em áreas primárias quanto secundárias (Oliveira & Cassaro, 1999).

São predadores oportunistas e sua dieta é composta por mamíferos, aves, répteis e invertebrados. Nos trópicos, presas de pequeno e médio porte são mais freqüentes enquanto que na América do Norte a predação é preferencial sobre grandes ungulados (Miotto, 2006). Iriarte *et al.* (1990) sugeriram que o menor tamanho corporal das onças-pardas nos trópicos e a baixa taxa de predação de animais de grande porte estejam ligados à competição interespecífica entre o puma e a onça pintada. Estudos no Brasil demonstram que animais adultos de grande porte como anta (*Tapirus terrestris*), bovinos e eqüinos, dificilmente são atacadas por onças pardas, mas o mesmo não acontece aos seus filhotes (Hornocker, 1970; Iriarte, et al. 1990, 1991). Quando preda um animal de grande porte, o puma tem o hábito de cobrir os restos da carcaça com folhas para protegê-la dos demais carnívoros e consumi-la posteriormente (Aranda-Sanchez, 1981).

Jorgenson & Redford (1993) fizeram um estudo comparativo da dieta da onça-parda em quatro localidades (Belize, Peru, Brasil e Paraguai) e concluíram que a classe dos mamíferos foi a mais capturada por esta espécie (95%), seguida de répteis, “outros” (4,2%) e aves (0,8%). Leite (2000) em um estudo no Paraná, Brasil, observou que as presas mais freqüentemente consumidas no Parque Nacional do Superagüi foram o tatu-galinha (28,6%), aves (15,5%) e o gambá (14,3%). Na APA de Guaraqueçaba destacaram o tatu-galinha, a cutia e o gambá (todos com 22,22%). Já na Área Especial de Interesse Turístico do Marumbi, as presas preferenciais foram roedores Cricetidae (22,76%), aves (16,71%) e marsupiais (14,08%). Estudos no Parque Nacional das Emas apontaram o consumo de tamanduá-mirim, capivara, cateto, cachorro-do-mato, além de lagartos, aves e animais doméstico (Silveira, 1999). Autar (1994) e Defler (1994) relatam também o consumo de siris, conchas e ouriços-do-mar pelo puma, e que parece ser comum a ingestão de animais marinhos quando estes predadores vivem próximo ao mar. Vidolin (2004) observou uma variação sazonal na utilização das presas sendo que durante a estação seca as presas mais consumidas foram cateto e tatu-galinha enquanto que na estação úmida o teiú foi a espécie mais consumida.

O tamanho dos testículos pode informar sobre o funcionamento do órgão e produção espermática dos animais (Amann, 1970; Amann and Schanbacher, 1983; França and Russell, 1998). Neste sentido, o índice gonadossomático representa a massa corpórea alocada em testículos e é calculada dividindo-se a massa de ambos os testículos pela massa corpórea, sendo expressa em porcentagem. A teoria que melhor explica as variações nos tamanhos relativos dos testículos entre as espécies é baseada no tipo de comportamento sexual, ou seja,

na frequência de acasalamentos (Kenagy and Trombulak, 1986). Neste sentido, há duas subdivisões: espécies cujos machos possuem baixa frequência de cópulas, ou seja, aquelas monogâmicas e aquelas poligâmicas, e espécies com elevada frequência de cópulas, em que vários machos copulam com uma fêmea. Sendo que os animais do primeiro grupo possuem testículos menores que os do segundo grupo, uma vez que estes competem pela produção de descendentes por meio da competição dos espermatozoides dentro da fêmea, sendo necessária maior produção de espermatozoides, e aqueles competem pelo direito pela cópula investindo sua energia em manifestações comportamentais (Harvey and Harcourt, 1984; Short, 1997). Os pumas apresentam índice gonadossomático de 3,3%. Este baixo valor é reflexo do seu comportamento sexual, em que uma fêmea raramente acasala com mais de um macho durante seu período reprodutivo (Hemker et al., 1992), Machos residentes defendem seus territórios agressivamente contra intrusos (Ross & Jalkotzy, 1992; Logan & Sweanor, 2001). A marcação do território pode ser feito por meio de vocalizações e marcações visuais, como deposição de fezes e urina e arranhaduras no solo e nas árvores (Anderson, 1983; Fonseca et al., 1994).

Os pumas são animais territorialistas e o tamanho da área de vida varia de 32 a 155 Km² no Pantanal (Crawshaw & Quigley, 1984) e 98 Km² no Parque Estadual do Morro do Diabo (Cullen, 1999). No Arizona, EUA, a área de vida observada para os machos adultos foi de 124 a 162 Km² e para as fêmeas foi de 25 a 176 Km² (SHAW, 1987). Riley (1998) observou que a densidade populacional do puma está correlacionada com seu habitat, sendo que em regiões de topografia heterogênea e cobertura vegetal mais densa encontram-se maior densidade populacional. Em áreas naturalmente ou artificialmente fragmentadas a população dessa espécie exibe uma estrutura de metapopulação, definida como um conjunto de populações semi-isoladas com certo grau de migração regular e intercâmbio genético (Sweanor et al., 2000). Indivíduos podem migrar por longas distâncias, mesmo em face de ambientes fragmentados (Ruth, et al., 1998). Anderson et al. (2004) documentaram dispersão de machos sub-adultos de até 450 Km da área natal.

Os pumas são carnívoros solitários e exibem comportamento de poligamia como estratégia reprodutiva, em que um macho dominante reproduz com fêmeas que se interpõem em seu território (Murphy, 1998). Machos e fêmeas possuem estratégias diferentes para alcançar o máximo sucesso reprodutivo. O sucesso reprodutivo para as fêmeas está relacionado com o número de filhotes viáveis até a idade adulta, para isso seu território deve

ser grande suficiente para garantir presas para manter-se e manter seus filhotes. Ainda neste sentido as fêmeas adultas se agrupam para garantir a segurança e sobrevivência dos filhotes (Shaw, 1987; Logan & Sweenor, 2001). O sucesso reprodutivo nos machos, no entanto, depende de sua habilidade de fertilizar o maior número de fêmeas possível, sendo assim os maiores, mais fortes e mais agressivos tem maior capacidade de competir com outros machos e manter longos períodos de dominância sobre o território, aumentando a possibilidade de acasalar com maior número de fêmeas (Weckerly, 1998).

A onça parda pode reproduzir durante o ano todo, porém alguns autores relatam maior frequência de nascimentos em certas épocas do ano em que o clima se encontra mais ameno (Anderson, 1983; Ross & Jalkotzy, 1992; Logan et al., 1996). A média de intervalo de partos descrita por Ross & Jalkotzy (1992) foi de 19,4 meses, já Lindzey et al. (1994) descrevem um intervalo de 24,3 meses e Spreadbury et al. (1996) relataram 18,3 meses de intervalo de partos. O ciclo estral dura entre 13 e 33 dias em animais de vida livre (Logan et al., 1996) e o estro 8 dias (Anderson, 1983; Hansen, 1992; Oliveira & Cassaro, 1999). Segundo Anderson (1983) e Logan et al. (1996) o período de gestação tem duração média de 92 dias (variando de 84 a 98). A quantidade de filhotes por ninhada é difícil de ser determinada em populações de vida livre devido ao comportamento da fêmea de esconder os filhotes em ninhos (Riley, 1998). Logan et al. (1996) observaram uma média de 3,0 a 3,4 filhotes por ninhada, enquanto que uma média de 3,1 foi observada por Spreadbury et al. (1996).

De acordo com Cimardi (1996) os filhotes se tornam independentes em torno dos dois anos de idade, já Ross & Jalkotzy (1992) relatam idade entre 12 e 18 meses para independência. A maturidade sexual, definida como momento do primeiro acasalamento, ocorre aos 21,4 meses nas fêmeas e 24,3 meses nos machos (Logan et al., 1996). Oliveira & Cassaro (1999) relatam maturidade sexual entre dois anos e meio e três anos de idade, enquanto que Lindzey (1987) relatam que machos alcançam a maturidade sexual por volta dos 24 meses. No entanto, as fêmeas podem ser mais precoces, por volta dos 20 meses. Ross & Jalkotzy (1992) observaram que em média aos 30 meses de idade se dá a primeira parição, e Lindzey et al. (1994) encontraram uma média de 26 meses para o nascimento da primeira ninhada.

O puma é classificado como vulnerável na Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção (IBAMA, 2003) e citada no apêndice II da CITES -

Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CITES, 2009). As principais ameaças à população desses grandes felinos são a redução de população de suas presas, caça predatória e modificação e fragmentação de seu habitat (IUCN, 1996). Uma das conseqüências da fragmentação das matas é a redução de refúgios e redução da população de presas. A caça de presas naturais do puma agrava ainda mais o problema da fragmentação, e por conseqüência estes predadores passam a consumir animais domésticos. Conforti & Azevedo (2003) observaram relação entre o aumento na predação de animais domésticos no entorno do Parque Nacional do Iguaçu com o aparente desaparecimento de uma das principais presas naturais do puma na região, o queixada (*Tayassu pecari*).

2.2. TECNOLOGIAS DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA E A CONSERVAÇÃO DAS ESPÉCIES

O primeiro felídeo surgiu no Oligoceno, há cerca de 30 milhões de anos (O'Brien, 1977) porém a dispersão das linhagens modernas só correu há aproximadamente 10 milhões de anos e a colonização da América do Sul somente há três a quatro milhões de anos (Indrusiak & Eizirik, 2003). Atualmente, a família Felidae é constituída por quatro subfamílias com 18 gêneros e 37 espécies estando todas, com exceção do *Felis catus*, ameaçadas de extinção (CITES, 2009). Oito espécies ocorrem em território brasileiro: gato do mato pequeno (*Leopardus tigrinus*), gato maracajá (*Leopardus wiedii*), gato palheiro (*Oncifelis colocolo*), gato mourisco (*Puma yagouaroundi*), gato geoffroyi (*Oncifelis geoffroyi*), jaguatirica (*Leopardus pardalis*), onça pintada (*Panthera onca*) e onça parda (*Puma concolor*) (Cubas et al., 2006).

Os felinos silvestres estão entre as espécies mais ameaçadas do mundo, (IUCN, 1996) e esta é uma situação generalizada para a maioria dos predadores neotropicais, que influenciam na dinâmica de populações e conseqüentemente, no equilíbrio ecológico como um todo (Redford, 1997). A conservação das espécies está intrinsecamente ligada à manutenção da variabilidade genética. Quando uma população é isolada geograficamente e fica sujeita à homozigose, vários fatores se aliam para desencadear o processo de extinção. Entre esses fatores estão a diminuição da fertilidade, maior susceptibilidade a doenças, aumento de anormalidades espermáticas e desbalanceamento endócrino de hormônios reprodutivos, o que afeta a espermatogênese, ovulação, morbidade e mortalidade perinatal (O'Brien & McCulloch, 1985; Wildt et al., 1987; Munson et al., 1996; Eizirik et al., 2001).

Estratégias de conservação objetivam manter e, se possível, aumentar a biodiversidade. A ação ideal para se alcançar este objetivo é preservar o hábitat da espécie (Wildt et al., 1997; Loi et al., 2001). No entanto, estratégias de conservação *in situ* nem sempre são suficientes na propagação de pequenas populações e manutenção de uma adequada variabilidade genética (Comizzoli, et al., 2000). Neste sentido estratégias de conservação *ex situ* objetivam auxiliar na conservação de uma população geneticamente viável por meio de estratégias de reprodução assistida e criopreservação de germoplasma (Andrabi & Maxwell, 2007).

As tecnologias de reprodução assistida como criopreservação de gametas, inseminação artificial, fertilização *in vitro* e transferência de embriões vêm sendo cada vez mais aplicadas (Swanson, 1998). Tais tecnologias 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). Além disso, podem permitir aumento no nascimento de filhotes de pais selecionados de forma a aumentar a diversidade da população e reduzir o intervalo entre os partos (Andrabi & Maxwell, 2007). A aplicação da inseminação artificial reduz também os riscos de transmissão de doenças infecciosas durante a cópula e os problemas com injúrias físicas durante a cópula, uma vez que felinos são naturalmente agressivos (Wildt, 1990).

A inseminação artificial já foi usada para reproduzir varias espécies de felinos entre elas: gato leopardo, *Prionailurus bengalensis* (Wildt et al., 1992a); guepardo, *Acinonyx jubatus* (Howard et al., 1992); tigre, *Panthera tigris* (Donoghue et al., 1990); jaguatirica, *Leopardus pardalis* (Swanson et al., 1996a); leopardo nebuloso, *Neofelis nebulosa* (Howard et al., 1996) e leopardo das neves, *Uncia uncia* (Roth et al., 1997). Tecnologias de fertilização *in vitro* foram estudadas em pumas, *Puma concolor* (Miller et al., 1990), tigres, *Panthera tigris* (Donoghue et al., 1990), guepardo, *Acinonyx jubatus* (Donoghue et al., 1990), gato montês, *Felis silvestris ornata* (Pope et al., 1993), felinos africanos (Pope, 2000), onça pintada, *Panthera onca* (Morato et al., 2000), jaguatirica, *Leopardus pardalis* e gato do mato pequeno, *Leopardus tigrinus* (Swanson et al., 2002).

As ferramentas de reprodução assistida podem ser extraordinariamente poderosas e merecem uma séria consideração, especialmente para programas de manejo *ex situ*, para serem usadas como coadjuvantes nos programas de reprodução utilizados na maioria dos zoológicos e centros de conservação (Wildt & Roth, 1987). Estudos de reprodução animal englobam uma diversidade de áreas que estão inter-relacionadas, incluindo biologia de

gametas, embriologia, endocrinologia e criobiologia. 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). A criopreservação de gametas viáveis é fundamental para a criação de um banco de germoplasma e importante para a manutenção do potencial reprodutivo no futuro. O desenvolvimento de protocolos de congelamento espécie específico, portanto, é de suma importância para a manutenção de uma reserva genética de populações.

2.3. COLETA DE SÊMEN EM FELINOS

Amostras de sêmen a serem utilizadas em programas de reprodução assistida podem ser obtidas por meio de vagina artificial (Sojka & Jennings, 1970a; Sojka et al., 1970b; Zambelli & Belluzzi, 1998), eletroejaculação (Platz et al., 1978; Dooley et al., 1983; Johnstone, 1984; Howard et al., 1986) ou coletado diretamente do epidídimo ou vasos deferentes (Howard et al., 1986; Axner, 1998).

A eletroejaculação é a técnica mais apropriada para animais silvestres, uma vez que pode ser realizada em animais anestesiados. Esta técnica envolve a estimulação dos nervos ligados aos órgãos reprodutores por meio de correntes elétricas fracas (Howard, 1993). Para isso é introduzido no reto do animal um transdutor, de tamanho e diâmetro compatível com o porte do animal, com eletrodos longitudinais posicionados ventralmente (Platz et al., 1978). A cada estímulo, o animal estende os membros pélvicos. Para a coleta do sêmen, o pênis é exposto pela aplicação de uma suave pressão em sua base, e o ejaculado é coletado em um pequeno frasco pré aquecido (Howard et al., 1986)

Diversos protocolos de eletroejaculação foram descritos para felinos. Howard et al. (1986) descreveu um protocolo que consiste na aplicação de um total de 80 estímulos elétricos de 2 a 5 V, aplicados em três séries (30, 30 e 20 estímulos), cada estímulo é aplicado de forma a demorar aproximadamente 1 s para ir de 0 V à voltagem desejada e dura aproximadamente de 2 a 3 segundos, entre um estímulo e outro há um intervalo de 2 a 3 segundos. Já Wildt *et al.* (1983) desenvolveram um protocolo que consiste na aplicação de oito séries com tensões de 2 a 6 V, organizados em três seqüências, totalizando 80 estímulos com três segundos de duração cada. Estes protocolos tem sido utilizados como modelo para a coleta de sêmen em várias espécies de felinos selvagens como o tigre, *Panthera tigris*

(Donoghue et al., 1990), onça parda, *Puma concolor* (Miller et al., 1990), jaguatirica, *Leopardus pardalis* (Swanson et al., 1996; Baudi, 2005), onça pintada, *Panthera onça* (Morato, 1998). Porém, na maioria destas espécies são relatadas baixas concentrações de espermatozóides, com freqüente contaminação com urina. Morais et al. (2002) e Queiroz (2003) relatam que em jaguatiricas esta contaminação com urina é observada em 69 a 75% das amostras coletadas.

Em um estudo com gatos domésticos observou-se que ejaculados obtidos por meio da eletroejaculação possuíram maior volume, menor concentração e menor número de espermatozóides totais em se comparando com coletas por meio de vagina artificial, uma vez que a eletroejaculação estimula a secreção das glândulas acessórias (Áxener & Linde-Forsberg, 2002). Segundo Pukazhenthii, et al. (2001) a morfologia espermática não é afetada pelo método de coleta, ao se comparar entre sêmen obtido por eletroejaculação e por vagina artificial. Pineda et al. (1984) relataram que procedimentos de estimulação elétrica e anestésias repetidas não afetaram a capacidade de ejaculação em gato doméstico.

Para a realização da eletroejaculação o animal deve estar anestesiado. Cuidado especial deve ser tomado na escolha do anestésico, uma vez que certos fármacos provocam o relaxamento da musculatura ao redor da bexiga o que pode resultar em contaminação do sêmen com urina durante a coleta e uma rápida perda da motilidade espermática. Esses fármacos compreendem o diazepam, derivados da fenotiazina tais como maleato de acepromazina, e anestésicos inalatórios, como o halotano e o isoflurano (Howard, 1993).

Diversos protocolos de anestesia foram descritos para coleta de sêmen por meio de eletroejaculação em felinos. Axner & Linde-Forsberg (2002) relataram para o gato doméstico o uso de medetomidina (80 µg/kg, SC) associada ao cloridrato de ketamina (5 mg/kg, IM). Zambeli et al. (2007) compararam os efeitos de anestésias com ketamina (Ketavet®) e medetomidina (Domitor®) em procedimentos de eletroejaculação e concluíram que a anestesia com medetomidina permitiu a obtenção de maior número de espermatozóides e verificaram não haver diferenças nas porcentagens de ejaculação retrógrada entre os dois protocolos. Morais et al. (2002) utilizaram dois protocolos em felinos silvestres: associação entre cloridrato de ketamina (20 mg/kg) e cloridrato de xilazina (1 mg/kg) e associação zolazepam/tiletamina (10 mg/kg). Patil et al. (1998) utilizaram associação de Ketamina (2,2 a 2,66 mg/Kg) e Xilazina (1,1 a 1,33 mg/Kg) para coleta de sêmen em leões e tigres.

Swanson et al (2003) relataram a utilização, para eletroejaculação em felídeos neotropicais, da combinação de tiletamina-zolazepan (5 – 10 mg/ kg) administrada por via intramuscular. Esta anestesia injetável produzia um plano anestésico adequado para eletroejaculação para todas as espécies com exceção do puma e do gato-mourisco. Tebet (2004) descreveu a utilização de três protocolos para indução anestésica para coleta de sêmen por eletroejaculação: 1) cloridrato de ketamina (15 mg/kg) e midazolan (0,5 mg/kg); 2) cloridrato de ketamina (15 mg/kg), midazolan (0,5 mg/kg) e tartarato de butorfanol (0,2 mg/kg); 3) Cloridrato de tiletamina/zolazepan (10 mg/kg), mantendo com anestesia inalatória com isoflurano, sendo que 53% dos ejaculados apresentaram contaminação por urina em pelo menos uma das séries. A autora observou ainda que animais em planos muito profundos ou superficiais e nos quais se utilizou tartarato de butorfanol, a incidência de contaminação por urina foi maior.

2.4. AVALIAÇÃO DO SÊMEN

O processo de criopreservação pode provocar danos aos espermatozóides e conseqüentemente reduzir a capacidade de fertilização da amostra (Howard et al., 1991a; Johnston et al., 1991a; Januskauskas et al., 1996; Watson, 2000; Hallap et al., 2006). A avaliação da qualidade espermática, portanto, é um passo necessário para se predizer a capacidade dos espermatozóides de fecundar um ovócito (Peña-Martínez, 2004).

A fertilidade dos espermatozóides pode ser estimada por meio de testes *in vivo* e *in vitro*. Testes *in vivo*, embora decisivos na determinação da fertilidade do sêmen, requerem um grande número de animais por tratamento avaliado e estão sob influências de outros fatores como, por exemplo, a fertilidade da fêmea, a detecção do momento e do método ótimo para a inseminação e a dose inseminada (Eilts, 2005). Análises feitas *in vitro* por sua vez são bastante práticas e possibilitam a avaliação simultânea de grande número de tratamentos, entretanto, para serem conclusivas necessitam de prévia confirmação de sua correlação com a taxa de fertilidade por meio de testes *in vivo*.

Os parâmetros *in vitro* mais comumente utilizados para estimar a fertilidade do sêmen congelado são avaliação da motilidade do espermatozóide, da integridade e da viabilidade da membrana espermática e a longevidade espermática. A motilidade espermática é necessária pra a colonização do oviduto e para uma fertilização normal (Yanagimachi, 1994; Scott, 2000). Este parâmetro é normalmente avaliado em termos de motilidade (porcentagem de

espermatozóides móveis de 0 a 100%) e vigor (intensidade do movimento de 0 a 5) (CBRA, 1998). A motilidade espermática é o parâmetro mais utilizado para se determinar a viabilidade espermática em amostras descongeladas e estudos mostram que há correlação positiva entre os valores desse parâmetro antes e após o congelamento (Defoin et al., 2007). É importante salientar que o efeito do processo de congelamento sobre a motilidade varia de uma amostra para outra (Defoin et al., 2008).

Os valores de vigor e motilidade espermática representam bons indicadores da função espermática, uma vez que a movimentação é uma manifestação dos componentes estruturais e funcionais do espermatozóide altamente correlacionada com a taxa de fertilidade, normalidade morfológica e integridade da membrana espermática (Smith et al., 1977; Oettlé, 1993; Peña-Martinez, 2004; Thomassen et al., 2006). Estes parâmetros, porém, são de difícil análise em se tratando de avaliações comparativas por tratar-se de valores distintos relativos a um mesmo parâmetro. Desta forma alguns autores utilizam o índice espermático como parâmetro de movimentação espermática (Morais et al., 2002). O índice espermático (IE) é calculado pela fórmula $IE = [\%motilidade + (vigor \times 20)/2]$ (Howard et al., 1993) e quando calculado após descongelamento, mostrou-se correlacionado diretamente com a taxa de penetração em ovócitos *in vitro* (Zambelli et al., 2006).

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

Embora ejaculados com alta proporção de espermatozóides anormais possam apresentar boa fertilidade, estudos *in vitro* mostraram correlações negativas entre a proporção de defeitos e a habilidade de penetração em oócitos (Axnér & Linde-Forberg, 2002). São poucos os estudos que correlacionam morfologia espermática com fertilidade em felinos (Donoghue et al. 1992a; Wildt et al. 1993; Axnér et al., 1996, 1997, 1998). Em um estudo com gatos domésticos, porém, Axnér & Linde-Forsberg (2007) correlacionaram diferentes patologias

com a fertilidade *in vivo*. Neste estudo somente as patologias de cabeça foram relacionadas com baixa fertilidade, e em contraste com os resultados em bovinos (Barth & Oko, 1989), um animal com elevadas proporções de gota citoplasmática proximal se mostrou fértil.

A etiologia das anormalidades específicas assim como seu impacto sobre a fertilidade ainda são controversos (Howard et al., 1986; Wildt et al., 1987) porém dificilmente espermatozóides com defeitos maiores na cabeça, danos acrossomais ou cauda fortemente dobrada, por exemplo, podem participar da fertilização (Wildt et al., 1988). Howard et al., (1993) observaram que a zona pelúcida representa uma barreira para espermatozóides com defeitos na cabeça. Espermatozóides com acrossoma anormal não possuem capacidade de aderir ao óvulo *in vitro* e conseqüentemente não apresentam capacidade de fertilização (Thundathil et al., 2000).

Em um estudo em pumas, Miller et al. (1990) observaram que mesmo ejaculados cotendo elevada incidência de espermatozóides pleiomórficos foram capazes de fertilizar ovócitos maturados *in vitro*. Ainda neste sentido, Donogue et al. (1992a) em um estudo com guepardos, não observaram relação entre o número ou tipo de espermatozóides morfológicamente anormais e o sucesso em fertilização *in vitro*, porém verificaram correlação positiva entre a motilidade espermática e a interação entre espermatozóide e ovócito. Os autores associaram este achado ao reduzido número de animais avaliados (6) e ao fato de que todos os animais apresentaram elevada taxa de espermatozóides morfológicamente anormais.

Não há estudos que mostram valores mínimos de diferentes parâmetros de avaliação espermática requeridos para se obter taxas normais de fertilidade em gatos, porém é razoável afirmar que quanto maior o número de espermatozóides morfológicamente normais com boa motilidade espermática melhor será a fertilidade da amostra (Áxener & Linde-Forsberg, 2002).

A longevidade espermática *in vitro* pode ser avaliada pela incubação do sêmen a temperatura semelhante à corporal, no intuito de mimetizar as condições encontradas no órgão genital feminino (Teste de Termorresistência). O teste de termorresistência consiste em incubar o sêmen descongelado a temperaturas que variam de 37 a 39°C por até seis horas e em se avaliar os valores de vigor e motilidade ao longo deste período (Fontbonne & Badinand, 1993; Peña-Martinez et al., 1998). Este teste é tido como um bom indicador da fertilidade espermática em várias espécies e baixas taxas de sobrevivência no teste de termorresistência

tem sido associado com baixa fertilidade (England, 1993). Em guepardos, o fator que mais se correlacionou com a penetração e fertilização de ovócitos *in vitro* foi o índice espermático (IE) ao longo do tempo, calculado em amostras incubadas a 38°C em meio Ham's F-b (Irvine Scientific, Santa Ana, GA) (Donoghue et al., 1992a). Neste estudo, o autor observou que para certos machos a sustentação da motilidade *in vitro*, do sêmen fresco, após seis horas estava positivamente correlacionada com o sucesso na fertilização *in vitro*.

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

A avaliação das características do ejaculado inclui a determinação do volume coletado, da cor e da aparência, da porcentagem de espermatozóides móveis (motilidade), assim como o vigor do movimento e a porcentagem de espermatozóides com membrana intacta, porcentagem de espermatozóides morfológicamente normais e a determinação da presença de células não espermáticas no ejaculado (CBRA, 2008). Diferentes patologias podem resultar em alterações seminais semelhantes, portanto, a avaliação do ejaculado deve ser analisada em conjunto com as características do doador (Stornelli, 2007). Mesmo felídeos taxonomicamente próximos apresentam características peculiares em seus ejaculados (porcentagem de espermatozóides pleiomórficos) e diferentes características hormonais, como concentração de LH e testosterona (Wildt et al., 1983, 1984, 1986, 1988).

2.5. TERATOSPERMIA EM FELINOS

A teratospermia é caracterizada como sendo uma porcentagem menor que 40% de espermatozóides normais presentes no ejaculado e a normospermia como uma porcentagem maior que 60% de espermatozóides normais presentes no ejaculado (Pukazhenthil et al., 2001; Neubauer et al., 2004). A teratospermia freqüentemente está presente em ejaculados de felídeos, incluindo certos gatos domésticos, mas os mecanismos celulares e moleculares que provocam este fenômeno são desconhecidos (Neubauer et al., 2004).

Em um estudo com gatos domésticos teratospérmicos, observou-se que estes animais apresentam concentrações de LH e FSH semelhantes aos indivíduos normospérmicos, porém aqueles apresentaram concentrações menores de testosterona em até 33% (Howard et al., 1990). Brown et al. (1991), no entanto, não observaram correlação entre a concentração de testosterona circulante e a proporção de espermatozóides normais em leões. Ainda se tratando de leões, Wildt et al. (1987) observaram que a população geograficamente isolada, que apresentava baixa variabilidade genética, apresentou concentração sérica de testosterona de 0,4-0,7 ng/mL enquanto que a população com grande variabilidade genética apresentou concentração de 1,2-1,8 ng/mL deste hormônio. Em outro estudo, pesquisadores observaram que a concentração de testosterona intra-testicular tende a ser menor (porém sem diferença estatística) em animais teratospérmicos (Neubauer et al., 2004).

Espermatozóides de machos teratospérmicos são mais susceptíveis aos danos provocados pelo frio e estresse osmótico, que promove ruptura da membrana (Pukazhenthil et al., 1999). Esperma de animais teratospérmicos possui 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., 1991b, 1993). Aparentemente não somente a quantidade absoluta de espermatozóides pleiomórficos, mas também fatores desconhecidos associados com espermatozóides morfolologicamente normais de animais teratospérmicos são responsáveis pelo insucesso da fertilização *in vitro* nestes animais (Howard et al., 1993). Autores sugerem 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 (Howard et al., 1993).

As anomalias mais freqüentemente em felinos são peça intermediária dobrada com e sem gota citoplasmática, cauda dobrada e cauda fortemente enrolada, além de alterações no acrossoma (Pukazhenthii et al., 2001; Howard et al., 1990). Animais teratospérmicos apresentaram como principais patologias peça intermediária dobrada com gota citoplasmática, gota citoplasmática proximal e distal e cauda dobrada (com e sem gota citoplasmática). Nesses animais patologias de cabeça, como micro/ macrocefalia e espermatozoides com duas/três cabeças, afetaram 3,3% das células em contraste com amostras de animais normospérmicos em que essas alterações apareceram em 0,4% dos espermatozoides (Howard et al., 1990).

Wildt et al. (1988) observaram um total de aproximadamente 73,5% de espermatozoides anormais ao avaliarem o ejaculado de puma, com destaque para cauda fortemente enrolada ($20\% \pm 4,4$), peça intermediária dobrada cauda fortemente dobrada com gota citoplasmática ($24,3\% \pm 6,5$) e cauda fortemente dobrada sem gota citoplasmática ($11\% \pm 3,8$). Neste estudo os animais apresentaram elevada porcentagem de espermatozoides anormais na presença de elevadas concentrações séricas de cortisol, demonstrando que há correlação negativa entre o aumento da atividade adrenal e o desempenho reprodutivo. Em outro estudo do ejaculado de puma Pukazhenthii et al., (2001) registraram uma média de 91,4% de espermatozoides anormais.

A incidência de patologias aparentemente é espécie específica. O guepardo, o puma e o leopardo tendem a apresentar ejaculados com elevadas proporções de cauda fortemente enrolada e cauda fortemente dobrada enquanto que em leões prevalecem gotas citoplasmáticas e cauda dobrada (Wildt et al. 1983, 1897, 1988). Em uma população de pumas (*Puma concolor coryii*) metade dos espermatozoides exibiu defeitos de acrossoma (Miller et al., 1990).

Uma pesquisa revelou que 22 de 28 espécies silvestres comumente produzem mais de 40% de espermatozoides anormais por ejaculado, um achado relacionado com redução na variabilidade genética da população ou mesmo de toda a espécie (Wildt et al., 1983; Wildt et al., 1992b; Howard, 1993). Guepardos, que possuem esperma com baixa motilidade e ejaculados com elevada porcentagem de espermatozoides anormais (> 70%) exibem taxas de aproximadamente 17% de ovócitos clivados após fertilização *in vitro* (Donogue et al., 1992a). Semelhantemente, o puma apresenta proporções extremamente elevadas de espermatozoides

anormais (>90%) e <10% de ovócitos clivados após fertilização *in vitro* (Donogue et al., 1990). Isso representa um contraste com os gatos domésticos, que rotineiramente apresentam mais de 70% de espermatozóides morfolologicamente normais e taxa de ovócitos clivados após fertilização *in vitro* de aproximadamente 60 a 80% (Johnston et al., 1991b; Donogue et al., 1992a; Wildt, et al., 1992b). Assim como os tigres, que apresentam <20% de espermatozóides anormais por ejaculado e taxas de ovócitos clivados após fertilização *in vitro* maiores que 60%, utilizando tanto espermatozóides a fresco quanto congelados (Donogue et al., 1990).

Estudos demonstraram que leões machos isolados geograficamente possuem menor diversidade genética e maior porcentagem de espermatozóides anormais em se comparando com indivíduos não isolados geograficamente (Wildt et al., 1986, 1987; O'brien et al., 1987). Ao se comparar a espermatogênese destas duas populações, observou-se que aqueles animais tetarospérmicos possuíam poucos túbulos seminíferos e poucas espermátides por secção de túbulo seminífero (Munson et al., 1996).

Para avaliar a relação entre a reduzida variabilidade genética e a teratospermia em felinos, pesquisadores induziram a homozigose em uma população de gatos domésticos. Neste estudo todos os animais filhos de relações incestuosas apresentaram ejaculados mais concentrados (77% a mais em relação aos pais) e porcentagens menores que 15% de espermatozóides normais (Howard et al., 1990; Pukazhenthil et al., 2001; Pukazhenthil et al., 2006). Análises histo-morfométricas destas duas populações revelaram que os animais teratospérmicos possuíam testículos aproximadamente 35% maiores que os normospérmicos e aproximadamente 40% mais volumosos. A contagem da população celular revelou que os teratospérmicos apresentavam mais espermatogônias, espermatócitos e espermátides arredondadas por túbulo, porém possuíam menos células de sertoli. Conseqüentemente, a proporção de espermatogônia, espermatócitos e espermátides arredondadas por célula de sertoli foi consideravelmente maior na população teratospérmica. Ainda neste sentido, observou-se que a proporção entre espermátides alongadas e células de sertoli também foi maior na população teratospérmica, assim como a eficiência da espermatogênese, que revelou ser até 100% maior nesta população. Em gatos teratospérmicos, portanto, as células de sertoli possuem reduzida capacidade de coordenar a espermatogênese, e conseqüentemente o aumento da produção de espermatozóides ocorre em detrimento à qualidade espermática (Neubauer et al., 2004).

Neubauer et al. (2004) observaram também que a frequência da fase da espermição foi maior nos animais teratospérmicos. Esta fase é o passo final da espermatogênese e é a mais vulnerável a perturbações como aporte inadequado de hormônios ou exposição ao estresse (Huang & Marshall, 1983; Russell, 1991; Sharpe, 1994).

2.6. DANOS CELULARES CAUSADOS PELA CRIOPRESERVAÇÃO

A habilidade de um espermatozóide fertilizar um ovócito e sustentar uma embriogênese normal está relacionada com alguns parâmetros como motilidade espermática, metabolismo, integridade da membrana plasmática, do acrossoma e do DNA (Foote, 2003). O processo de criopreservação inclui várias etapas, desde a coleta, envasamento e diluição da amostra para o congelamento até o descongelamento e inseminação, cada uma delas pode provocar danos aos espermatozóides e conseqüentemente provocar redução em todos esses parâmetros e reduzir por volta de 50% o percentual de espermatozóides capazes de fertilizar um ovócito (Howard et al., 1991a; Johnston et al., 1991a; Januskauskas et al., 1996; Watson, 2000; Luvoni et al., 2003; Hallap et al., 2006).

Como conseqüência do resfriamento, alguns pesquisadores relataram redução na motilidade espermática entre 43,5 e 52,2% (Glover & Watson, 1985), além da redução no vigor espermático e aumento nas alterações morfológicas com danos no acrossoma evidentes (Pukazhenthil et al., 1999; Wood et al., 1993; Swanson et al., 1996b). O declínio da motilidade espermática pode ocorrer devido às mudanças na osmolaridade, ao transporte passivo e mudanças na membrana plasmática da região da cauda, combinadas com alterações na energia disponível ou danos aos elementos do axonema (Watson, 1995).

Ao se expor espermatozóides à queda de temperatura ocorrem proporcionalmente à rapidez do resfriamento, danos estruturais na membrana e alterações metabólicas na célula que se refletem na diminuição irreversível da motilidade espermática, sendo esse fenômeno conhecido como choque térmico (Amann & Pickett, 1987; Holt, 2000).

À medida que se inicia o resfriamento dos espermatozóides e particularmente entre 5 e -15°C ocorrem mudanças no estado físico dos lipídeos que alteram sua fluidez, mudanças estas que são revertidas apenas parcialmente no descongelamento (Holt & North, 1984; De Leeuw et al., 1990; Drobnis et al., 1993). O processo de resfriamento resulta numa movimentação dos fosfolipídeos da membrana celular, que se agrupam em domínios contendo moléculas semelhantes, onde sofrem uma mudança de fase, cristalizando-se (Hammerstedt et al., 1990;

Watson, 2000). Por consequência do aparecimento destes domínios de lipídios cristalizados, restam apenas pequenas regiões contendo lipídeos na fase líquida onde proteínas ficam enclausuradas. A agregação destas proteínas pode resultar em um aumento da permeabilidade da membrana e redução da função metabólica, além de afetar a interação ente o espermatozóide e o óvulo (Amann & Pickett, 1987; Watson, 2000).

Dentre os lipídios da membrana celular, o colesterol tem papel fundamental na sobrevivência da célula ao processo de congelamento, uma vez que ele torna a membrana naturalmente menos flexível e fluida e desta forma, menos susceptível a alterações (Bailey et al., 2000; Holt, 2000). A proporção de ácidos graxos insaturados e saturados presentes na membrana também influencia sua susceptibilidade a crioinjúrias, uma vez que determina uma maior ou menor tendência a sofrer alterações conformacionais quando exposta a baixas temperaturas (Amann & Pickett, 1987; Hammerstedt et al., 1990). A composição lipídica da membrana celular dos espermatozoides varia significativamente entre espécies e mesmo entre indivíduos da mesma espécie explicando de certa forma, variações observadas na congelabilidade do sêmen (Cross, 1998; Watson, 2000).

Fosfolipídeos polinsaturados normalmente possuem conformação de cone invertido e na presença de monossacarídeos, elevadas concentrações de sais, cálcio, ou quando expostos ao processo de resfriamento, mudam a conformação para uma mais cônica. Um grupo destes fosfolipídeos pode assumir uma conformação circular, com inversão da sua estrutura (cabeças voltadas para dentro e lipídeos para fora), denominada formação hexagonal ou micela invertida. Tais conformações podem ser transitórias, porém para certos fosfolipídeos são permanentes. As formações hexagonais funcionam como canais hidrofílicos por onde podem passar íons e outras moléculas pequenas (Ohki et al., 1988).

À medida que a temperatura cai, a formação de ATP reduz e a bomba de sódio potássio perde sua capacidade de translocar estes íons. Desta forma o potássio passa para o meio intracelular em uma taxa mais baixa que para o meio extracelular, o que reduz a concentração intracelular deste íon. A proporção Sódio/potássio, portanto, fica alterada, o que resulta numa despolarização parcial da membrana, abrindo canais de cálcio dependentes de voltagem e promovendo influxo de cálcio. O aumento da concentração de cálcio intracelular pode resultar na ativação de fosfolipases que aumentarão a hidrólise de fosfolipídeos. Tais alterações

podem resultar em um aumento da permeabilidade mitocondrial e danos à membrana plasmática, e conseqüentemente na morte celular (Amann & Pickett, 1987).

À medida que a temperatura cai até níveis abaixo de zero grau, a água contida no meio extracelular sofre cristalização. A água contida no meio intracelular possui ponto de fusão mais baixo que a extracelular, por isso não se congela a esta temperatura (Watson, 1995). Quando sob taxas de resfriamento lentas, a saída de água das células é suficiente para provocar aumento das concentrações dos solutos intracelulares. Neste caso, a célula fica progressivamente desidratada, porém não há formação de cristais de gelo intracelulares. Por outro lado, caso a velocidade de congelamento seja moderada a rápida, a taxa de saída de água é baixa e a água que permanece no meio intracelular congela, formando cristais de gelo grandes, que são muito danosos aos espermatozoides (Watson, 2000). Por fim, quando sob taxas de congelamento extremamente rápidas há formação de microcristais de gelo no meio intracelular, que são menos danosos à célula. Estes microcristais, no entanto, podem sofrer recristalização se o descongelamento for lento, formando cristais maiores, deletérios à célula (Farrant et al., 1977). Cristais de gelo causam ruptura das membranas celulares quando as células são resfriadas rapidamente ($-4^{\circ}\text{C}/\text{min}$) da temperatura ambiente até 5°C , taxas menores de resfriamento ($-0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$), no entanto, podem minimizar este dano à célula (Pukazhenthil et al., 1999).

O processo de descongelamento também influencia na integridade celular e a sobrevivência da célula requer que a taxa de descongelamento esteja em concordância com a taxa de congelamento (Mazur, 1984). Resumidamente, para taxas de congelamento rápidas devem-se utilizar taxas de descongelamento rápidas e vice-versa (Amann & Pickett, 1987).

Danos na membrana celular provocados pela criopreservação incluem mudanças na composição dos lipídeos, fluidez e permeabilidade da membrana plasmática, e alterações na membrana acrossomais (Januskauskas et al., 2003). Uma das conseqüências da desestabilização da membrana é ocorrência prematura da reação acrossomal, o que reduz a sobrevivência do espermatozoide e sua fertilidade. Suas membranas passam por mudanças semelhantes àquelas observadas durante a capacitação, as membranas se tornam permeáveis ao cálcio que promove tanto a capacitação quanto a reação acrossomal. A viabilidade desses espermatozoides é limitada, pois quando capacitados não possuem sobrevivência grande e normalmente, essa reação ocorre quando eles estão próximos ao ovócito. Além disso,

espermatozoides que sofreram capacitação ou reação no acrossoma são menos capazes de reagir ao estresse osmótico e possuem motilidade alterada (Flesch & Gadella, 2000). A reação acrossomal prematura também foi descrita em espermatozoides resfriados, com alterações no acrossoma associadas com danos celulares irreversíveis (Bedford, 1970). O espermatozoide deve sofrer capacitação e reação acrossomal para penetrar no óvulo e isso só é possível caso a integridade do acrossoma não tenha sido alterada durante o processamento (Luvoni et al., 2003).

O crioprotetor usado rotineiramente (glicerol) promove proteção às células das conseqüências da cristalização ao aumentar a fração de água não congelada no meio extracelular (Nelson et al., 1999). Embora o glicerol mostre-se extremamente eficiente como crioprotetor sabe-se que ele apresenta efeito tóxico sobre o espermatozoide, em determinadas concentrações e temperaturas, entretanto, a toxicidade do glicerol varia significativamente entre as diferentes espécies (Fahy, 1986; England, 1993; Holt, 2000; Santos et al., 2003; Pesch & Bergmann, 2006). Durante o congelamento há movimentação de glicerol para o interior da célula, e no descongelamento este crioprotetor se desloca de volta para o meio extracelular. Quando a permeabilidade da membrana é insuficiente para acomodar esse movimento há um dano permanente a ela. Os crioprotetores também alteram a polaridade celular e a permeabilidade da membrana plasmática (Amann & Pickett, 1987).

As proteínas do citoesqueleto apresentam despolimerização dependente da temperatura, estas alterações promovem sérias implicações para a viabilidade espermática (Watson, 1995). Spungin et al. (1995) postularam que a despolimerização dos filamentos do citoesqueleto é um passo necessário que permite a aproximação da membrana plasmática promovendo a exocitose do acrossoma. Aparentemente isso contribui para uma fusão desorganizada das membranas durante o resfriamento ou congelamento.

2.7. CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN EM FELINOS

O sucesso na criopreservação de espermatozoides do gato doméstico foi apresentado nos anos 70 (Platz et al., 1978). Atualmente existem várias descrições de protocolos de congelamento de sêmen em gato doméstico (Axnér & Linde-Forsberg, 2002; Lengwinat & Blottner, 1994; Luvoni et al., 2003; Zambelli et al., 2002) e em felídeos selvagens (Howard, 1993; Swanson et al., 1996b; Pukazhenthil et al., 2001).

Alguns danos causados pela criopreservação podem ser evitados ou pelo menos minimizados pela diluição da amostra em meio adequado para criopreservação. Um diluente ideal para o sêmen de felinos, no entanto, ainda não foi determinado (Luvoni et al., 2003). Platz et al. (1978) usaram para congelar sêmen de gato doméstico um diluente descrito para espermatozoides de cão, a base de 20% gema de ovo, 11% lactose e 4% glicerol. Donogue et al. (1992b) congelaram sêmen de tigre com esse mesmo meio e descreveram um declínio na motilidade de 10 a 40% após descongelamento. Byers et al. (1989) obtiveram resultados semelhantes usando meio contendo 7,5% de glicerol, nesta mesma espécie.

Stander-Breedt et al. (2004) testaram o efeito de cinco diferentes protocolos (4 tratamentos e um grupo controle) para congelamento de sêmen de leão (*Panthera leo*). Os autores utilizaram um meio de diluição comercial (Bilady1. Minitub, GmbH, Germany) a base de TRIS-Citrato, adicionado de gema de ovo (20% v/v) e avaliaram a qualidade espermática em meios acrescidos de glicerol ou DMSO a 4 e 8%. A motilidade declinou de 85-95% no sêmen fresco para 7-21% nas amostras descongeladas. Os autores observaram não ter diferenças entre os quatro tratamentos, porém no grupo controle (sem adição de crioprotetor) não houve espermatozoides móveis após o descongelamento.

Além da escolha do crioprotetor, o protocolo de criopreservação deve considerar o protocolo de congelamento da amostra, determinando a velocidade das várias etapas deste processo, deste a taxa de resfriamento, passando pelo tempo de equilíbrio até a taxa de congelamento. A taxa de resfriamento representa a velocidade em que se resfria o sêmen da temperatura corporal ou ambiente até 4°C, sendo taxas muito rápidas associados a maiores danos em decorrência do choque térmico (Watson, 2000). O tempo de equilíbrio representa uma pausa durante o protocolo de congelamento na qual o sêmen é mantido por determinado período de tempo a temperaturas próximas de 4°C. Esta pausa possibilita o desenvolvimento de máxima resistência do espermatozoide aos efeitos deletérios do congelamento, por meio de adequada penetração do glicerol, influxo de íons e alterações de membrana (Watson, 1979; England, 1993, Santos et al., 2003).

O sêmen pode ser criopreservado em palhetas, ampolas ou em pellets. Pope et al. (1991) demonstraram que em felinos o congelamento com palhetas apresentaram melhores resultados se comparado com o congelamento em pellets, com uma redução de 43 e 76% na motilidade, respectivamente e redução na proporção de espermatozoides com acrossomas normais de 30%

(palheta) e 66% (pellet). Os autores descreveram também que uma taxa razoável para o congelamento (+5°C a -80°C) é de -10°C/min.

Zambelli et al. (2002) compararam cinco taxas de congelamento para sêmen de gatos domésticos. Todas as amostras foram diluídas em meio à base de TRIS com 20% v/v de gema de ovo e glicerol a 4%, cada palheta foi refrigerada a uma taxa de -0,2°C/min com tempo de equilíbrio de 25 minutos. Foram comparadas taxas de congelamento de -3,85°C/min, -9°C/min, -22,8°C/min, -36°C/min e -43°C/min. As amostras foram descongeladas por 30 seg a 37°C. Os autores observaram que apesar de algumas taxas demonstrarem diferenças na motilidade espermática e percentual de acrossomas normais, essas diferenças não tiveram relevância biológica. A taxa de -3,85°C/min (lenta), no entanto, resultou em valores de motilidade maiores após o descongelamento. Posteriormente, Zambeli et al. (2006) avaliaram a fertilidade de sêmen congelados a uma taxa de -3,85°C/min (em recipiente de 25 cm de diâmetro/ 47 cm de altura, a uma altura de 3 cm da lâmina de nitrogênio) e obtiveram alta taxa fertilidade in vitro, de 83,2% (em ovócitos classe I e II).

Ao congelar sêmen de leão e tigre, Patil et al. (1998) utilizaram meio a base de TES e dextrose para congelamento em vapor de nitrogênio, a uma altura de 5 a 8 cm da lâmina do líquido. Os autores obtiveram uma redução na motilidade espermática de 53 e 61% na amostra a fresco para 24 e 30% após o descongelamento, nos tigres e leões respectivamente.

Em felinos, a fertilidade por inseminação artificial com sêmen criopreservado é menor em se comparando a fertilidade com sêmen a fresco, fato que pode ser compensado inseminando-se uma dose maior de espermatozóides, próximo ao local da fertilização, por meio da inseminação intra-uterina (Tsutsui et al., 2000).

2.9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amann, R. P., Pickett, B. W. (1987). Principles of Cryopreservation and Review of Cryopreservation of Stallion Spermatozoa. *Equine Veterinary Science*, 7(3), 145 – 173.

Andrabi, S. M. H., Maxwell, W. M. C. (2007). A Review of Reproductive Biotechnologies for Conservation of Endangered Species. *Animal Reproduction Science*, 99(3-4), 223 – 243.

Anderson Jr., C. R., Lindzey, F. G., & McDonald, D. B. (2004). Genetic Structure of Cougar Populations across the Wyoming Basin: Metapopulation or Megapopulation. *Journal of Mammalogy*. 85(6), 1207– 1214.

Anderson, A. E. (1983). A Critical Review of Literature on Puma (*Felis concolor*) (Special Report). *Denver: Colorado Division of Wildlife, Research Section, 54(8), 1 – 92.*

Aranda-Snachez, J. M. (1981). *Rastros de los Mamíferos Silvestres de México: Manual de Campo*. México: Instituto Nacional de Investigaciones Sobre Recursos Bióticos.

Autar, L. (1994). Sea Turtles Attacked and Killed by Jaguars in Suriname. *Marine Turtle Newsletter, 67, 11 – 12.*

Axnér, E. (1998). Mating and Artificial Insemination in Domestic Cats. In: Simpson, G., England, G. C., Harvey, M. (eds), *British Small Animal Veterinary Association Manual of Small Animal Reproduction and Neonatology* (105 – 111). Cheltenham: BSVA.

Axnér, E., Linde-Forsberg, C. (2007). Sperm Morphology in the Domestic Cat, and its Relation with Fertility: A Retrospective Study. *Reproduction in Domestic Animals, 42(3), 282 – 291.*

Axnér, E., Linde-Forsberg, C. (2002). Semen Collection and Assessment, and Artificial Insemination in the Cat. In: Concannon, P.W., England, G., Verstegen, J., Linde-Fosber, C. (Eds.), *Recent Advances in Small Animal Reproduction*. Ithaca: International Veterinary Information Service (www.ivis.org), Document No. A1228,0702. Acessado em 11 jan. 2009 em, <http://www.ivis.org/advances/Concannon/axner/chapter_frm.asp?LA=1>.

Axnér, E., Ström-Holst, B., Linde-Forsberg, C. (1998). Morphology of Spermatozoa in the Cauda Epididymidis Before and After Electroejaculation and a Comparison with Ejaculated Spermatozoa in the Domestic Cat. *Theriogenology 50(6), 973 – 979.*

Axnér, E., Ström, B., Linde-Forsberg, C. (1997). Sperm Morphology is Better in the Second Ejaculate Than in the First in Domestic Cats Electroejaculated Twice During the Same Period of Anesthesia. *Theriogenology, 47(4), 929 – 934.*

Axnér, E., Ström, B., Linde-Forsberg, C., Gustavsson, I., Lindblad, K., Wallgren, M. (1996). Reproductive Disorders in 10 Domestic Male Cats. *Journal of Small Animal Practice, 37(8), 394 – 401.*

Bach, E. L., Amann, R. P., Bowen, R. A., Franz, D. (1989). Changes in Quality of Spermatozoa During Cryopreservation: Plasma Membrane Integrity and Motion Characteristics. *Theriogenology, 31(2), 283 – 298.*

Bailey, L.J., Bilodeau, J.F., Cormier, N. (2000). Semen Cryopreservation in Domestic Animals: a Damaging and Capacitating Phenomenon. *Journal of Andrology, 21(1), 1 – 7.*

Barratt, C. L. R., Osborn, J., Harrison, P. E., Monks, N., Dunphy, B. C., Lenton, E. A., et al. (1989). The Hypo-Osmotic Swelling Test and the Sperm Mucus Penetration Test in Determining Fertilization of The Human Oocyte. *Human Reproduction, 4(4), 430 – 434.*

Barth, A. D., Oko, R. J. (1989). *Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa*. Iowa State University Press Inc., Ames.

Bedford, J. M. (1970). Sperm Capacitation and Fertilization in Mammals. *Biology of Reproduction*, 2, 128 – 158 (Suppl 2).

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

Brown, J. L., Bush, M., Packer, C., Pusey, A. E., Monfort, S. L., O'brien, S. J., et al. (1991). Developmental Changes in Pituitary–Gonadal Function in Free-Ranging Lions (*Panthera Leo Leo*) of the Serengeti Plains and Ngorongoro Crater. *Journal of Reproduction and Fertility*, 91, 29 – 40.

Byers A. P., Hunter, A. G., Seal, U. S., Binczik, G. A., Graham, E. F., Reindl, N. J., Tilson, R. L. (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.

Caughley, G. (1977). *Analysis of Vertebrate Populations*. New York: Wiley & Sons.

Colégio Brasileiro de Reprodução Animal - CBRA. (1998). *Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal* (2nd ed.), Belo Horizonte, Brasil: Author.

Check, J. H., Katsoff, D., Check, M. L. (2001). Some Semen Abnormalities May Cause Infertility by Impairing Implantation Rather Than Fertilization. *Medical Hypotheses*, 56(5), 653 – 657.

Check, J. H., Stumpo, L., Lurie, D., Benfer, K., Callan, C. (1995). A Comparative Prospective Study Using Matched Samples to Determine The Influence of Subnormal Hypoosmotic Test Cores of Spermatozoa on Subsequent Fertilization and Pregnancy Rates Following In Vitro Fertilization. *Human Reproduction*, 10, 1197 – 1200.

Cimardi, A. V. (1996). *Mamíferos de Santa Catarina*. Florianópolis: FATMA.

Clarke, R. N., Johnson, L. A. (1987). Effect of Liquid Storage and Cryopreservation of Boar Spermatozoa on Acrossomal Integrity and the Penetration of Zona-Free Hamster Ova In Vitro. *Gamete Research*, 16, 193 – 204.

Comizzoli, P., Mermillod, P., Mauget, R., (2000). Reproductive Biotechnologies for Endangered Mammalian Species. *Reproduction Nutrition Development*, 40, 493 – 504.

Conforti, V. A., Azevedo, F. C. C. (2003). Local Perceptions of Jaguars (*Panthera onca*) and Pumas (*Puma concolor*) in the Iguaçu National Park Area, South Brazil. *Biological Conservation*, 111(2), 215 – 221.

Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora – CITES. *CITES Species Databases*. Acessado em 10 de jan. 2009., em <<http://www.cites.org/eng/resources/species.html>>

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

Corson, W.H. (1996). *Manual Global de Ecologia* (2nd Ed.). São Paulo, Brasil: Augustus.

Crawshaw Jr, P. G., Quigley, H. B. (1984). *A Ecologia do Jaguar ou Onça-pintada no Pantanal*. Relatório Final – Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Brasília, DF.

Cross, N. (1998). Role of Cholesterol in Sperm Capacitation. *Biology of Reproduction*, 59, 7 – 11.

Cubas Z. S., Silva J. C. R., Catão-Dias J. L.(2006). *Tratado de Animais Selvagens*. São Paulo, Brasil:Roca.

Cullen JR, L. (1999). *Status da Conservação dos Grandes Carnívoros e Seu Potencial como “Detetives Ecológicos” para a Mata Atlântica do Pontal do Paranapanema, São Paulo*. Relatório Conclusivo – Fundação O Boticário de Proteção à Natureza (FBPN) – divulgação restrita.

Defler, T. R. (1994). Jaguars Eat Dolphins, too. *Trianea*, 5, 415 – 416.

Defoin, L., Granados, A., & Donnay, I. (2008). Analysing Motility Parameters on Fresh Bull Semen Could Help to Predict Resistance to Freezing: A Preliminary Study. *Reproduction in Domestic Animals*, 43(5), 606 – 661.

De Leeuw, F. E., Chen, H, -C., Colenbrander, B., Verkleij, A. J. (1990). Cold-Induced Ultrastructural Changes in Bull and Boar Sperm Plasma Membranes. *Cryobiology*, 27(2), 171 – 183.

Donoghue, A. M., Howard, J. G., Byers, A. P., Goodrowe, K. L., Bush, M., Blumer, E., et al.(1992a). Correlation of Sperm Viability with Gamete Interaction and Fertilization In Vitro in the Cheetah (*Acinonyx Jubatus*). *Biology of Reproduction*, 46, 1047 – 1056.

Donoghue, A. M., Johnston, L. A., Seal, U. S., Armstrong, D. L., Simmons, L. G., Gross, T., et al. (1992b). Ability of Thawed Tiger (*Panthera Tigris*) Spermatozoa to Fertilize Conspecific Eggs and Bind and Penetrate Domestic Cat Eggs *In Vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility*, 96, 555 – 564.

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*). *Biological Reproduction*, 46, 733 – 744.

Dooley, M. P., Murase, K., Pineda, M. H. (1983). An Electroejaculator for the Collection of Semen From the Domestic Cat. *Theriogenology*, 20(3), 297 – 310.

Drobnis, E. Z., Crowe, L. M., Berger, T., Anchoroguy, T., Overstreet, J. W., Crowe, J. H. (1993). Cold Shock Damage is Due to Lipid Phase Transitions in Cell Membranes: a Demonstration Using Sperm as a Model. *Journal of Experimental Zoology*, 265(4), 432 – 437.

Eilts, B. E. (2005). Theoretical Aspects of Canine Cryopreserved Semen Evaluation. *Theriogenology*, 64(3), 685 – 691.

Eizirik, E.; Kim, J.H.; Raymond, M.M.; Grawshaw Jr, P.G.; O'Brien, S.J.; Johnson, W.E. (2001). Phylogeography, Population History and Conservation Genetics of Jaguars (*Panthera onca*, Mammalia, Felidae). *Molecular Ecology*, 10(1), 65 – 79.

Emmons, L. H. (1990). *Neotropical rainforest mammals: a field guide*. Chicago: The University of Chicago Press.

Emmons, L. H., Feer, F. (1997). *Neotropical Rainforest Mammals: A field Guide*. (2nd ed.) Chicago: The University of Chicago Press.

England, G. C. (1993). Criopreservation of Dog Semen: a Review. *Journal of Reproduction & Fertility*, 47, 234 – 255 (Suppl).

Fahy, G.M. (1986). The Relevance of Cryoprotectant “Toxicity” to Cryobiology. *Cryobiology*, 23(1), 1 – 13.

Farrant, J., Walter, C. A., Lee, H. & McGann, L. E. (1977). Use of Two Step Cooling Procedure to Examine Factors Influencing Cell Survival Following Freezing and Thawing. *Cryobiology*, 14(3), 273 – 286.

Flesch F. M., Gadella, B. M. (2000). Dynamics of the Mammalian Sperm Plasma Membrane in the Process of Fertilization. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1469(3), 197 – 235.

Fonseca, G. A. B., Rylands, A. B., Costa, C. M. R., Machado, R. B., Leite, Y. L. R. (1994). *Livro Vermelho dos Mamíferos Brasileiros Ameaçados de Extinção*. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas.

Fontbonne, A., Badinand, F. (1993). Studies on Freezing Dog Spermatozoa: Effect of Glycerol on Motility After Thawing. *Journal of Reproduction & Fertility Suppl*, 47, 531 – 532.

Foote, R.H. (2003). Fertility Estimation: a Review of Past Experience And Future Prospects. *Animal Reproduction Science*, 75(1-2), 119 – 139.

Galvão, W. N. (1978). O Impossível Retorno. In: *Mitológica Rosiana* (pp. 13-35). São Paulo, Brasil: Editora Ática.

Glover, T. E., Watson, P. F. (1985). The Effect of Buffer Osmolality on the Survival of Cat (*Felis Catus*) Spermatozoa at 5°C. (Abstract). *Theriogenology*, 24(4), 449.

Gonyea, W.J. (1976). Adaptive Differences in Body Proportions of Large Felids. *Acta Anatomica*, 96(1), 81 – 96.

Gravance, C. G., Vishwanath, R., Pitt, C., Garner, D. L., Casey, P. J. (1998). Effects of Cryopreservation on Bull Sperm Head Morphometry. *Journal of Andrology*, 19(6), 704 – 709.

Hallap, T., Nagy, S., Jaakma, U., Johannisson, A., Rodriguez- Martine, H. (2006). Usefulness of a Triple Fluorochrome Combination Merocyanine 540 / Yo-Pro 1 / Hoechst 33342 in Assessing Membrane Stability of Viable Frozen-Thawed Spermatozoa from Estonian Holstein AI Bulls. *Theriogenology*, 65, 1122 – 1136.

Hammerstedt, R. H., Graham, J. K., Nolan, J. P. (1990). Cryopreservation of Mammalian Sperm: What we Ask Them to Survive. *Journal of Andrology*, 11(1), 73 – 87.

Hansen, K. (1992). *Cougar: the American Lion*. Northland Publishing, Flagstaff.

Heitland, A. V., Jasko, D. J., Squires, E. L., Graham, J. K., Pickett, B. W., Hamilton, C. (1996). Factors Affecting Motion Characteristics of Frozen – Thawed Stallion Spermatozoa. *Equine Veterinary journal*, 28(1), 47 – 53.

Holt, W. V. (2000). Basic Aspects of Frozen Storage of Semen. *Animal Reproduction Science*, 62(1-3), 3 – 22.

Holt, W. V., Pickard, A. R. (1999). Role of Reproductive Technologies in Genetic Resource Banks in Animal Conservation. *Reviews of Reproduction*, 4, 143 – 150.

Holt, W. V., North, R. D. (1984). Partially Irreversible Cold-Induced Lipid Phase Transitions in Mammalian Sperm Plasma Membrane Domains: Freeze-Fracture Study. *Journal of Experimental Zoology*, 230(3), 473 – 483.

Hornocker, M. G. (1970). An Analysis of Mountain Lion Predation Upon Mule Deer and Elk in The Idaho Primitive Area. *Wildlife Monographs*, 21, 3 – 39.

Hornocker, H.G. (1969). Winter Territoriality in Mountain Lions. *Journal Wildlife Management*, 33(3), 457 – 464.

Howard, J.G. (1993). Semen Collection and Analysis in Nondomestic Carnivores. In: Fowler, M. E. (Ed.), *Zoo and Wild Animal Medicine III*, (pp. 390-399). Philadelphia: WB Saunders Co

Howard, J. G., Donoghue, A. M., Johnston, L. A., Wildt, D. E. (1993). Zona Pellucida Filtration of Structurally Abnormal Spermatozoa and Reduced Fertilization in Teratospermic Cats. *Biology of Reproduction*, 49, 131 – 139.

Howard, J.G.; Barone, M.A.; Donoghue, A.M.; Wildt, D.E. (1992). The Effect of Preovulatory Anaesthesia on Ovulation in Laparoscopically Inseminated Domestic Cats. *Journal of Reproduction & Fertility*, 96, 175 – 186.

Howard, J.G.; Bush, M., Morton, C., Morton, F., Wentzel, K. & Wildt, D. E. (1991a). Comparative Semen Cryopreservation in Ferrets (*Mustela Putorius Furo*) and Pregnancies After Laparoscopic Intrauterine Insemination with Frozen–Thawed Spermatozoa. *Journal of Reproduction & Fertility*, 92, 109 – 118.

Howard, J. G., Bush, M., Wildt, D. E. (1991b). Teratospermia in Domestic Cats Compromises Penetration of Zona-Free Hamster Ova and Cat Zonae Pellucidae. *Journal of Andrology*, 12(1), 36 – 45.

Howard, J. G., Brown, J. L., Bush M., And Wildt, D. E.. (1990). Teratospermic and Normospermic Domestic Cats: Ejaculate Traits, Pituitary-Gonadal Hormones, and Improvement of Spermatozoa Motility and Morphology After Swim-Up Processing. *Journal of Andrology*, 11(3), 204 – 215.

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

Huang, H. F. S., Marshall, G. R. (1983). Failure of Spermatid Release Under Various Vitamin a States — an Indication of Delayed Spermiation. *Biology of Reproduction*, 28, 1163 – 1172.

Indrusiak, C., Eiziric, E. (2003). Carnívoros. In: Fontana, C.S.; Bencke, G.A.; Reis, R.E. *Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada do Rio Grande do Sul*, (pp. 507 – 533). Porto Alegre: EDIPUCRS.

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA. (2003). Portaria 37/92. Lista Oficial das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. Brasília, DF: Author. Acesso 12 jan. 2009, em <http://www.ibama.gov.br>.

Iriarte, J. A., Franklin, W. L., Johnson, W. E. & Redford, K. H. (1990). Biogeographic Variation of Food Habits and Body Size of the American Puma. *Oecologia*, 85(2), 185 – 190.

Iriarte, J. A., Johnson, W. E. & Franklin, W. L. (1991). Feeding Ecology of the Patagonia Puma in Southernmost Chile. *Revista Chilena de Historia Natural*, 64, 145 – 156.

Internacional Union for Nature Conservaion - IUCN/SSC Cat Specialist Group. (1996). *Status Survey and Conservation Action Plan Wild Cats* (Nowell, K., Jackson, P., Comp. & Ed.). Gland, Switzerland:Author.

Januskauskas, A., Lukoseviciute, K., Nagy, S., Johannisson, A., Rodriguez-Martinez, H. (2005). Assessment of the Efficacy of Sephadex G-15 Filtration of Bovine Spermatozoa for Cryopreservation. *Theriogenology*, 63(1), 160 – 178.

Januskauskas, A., Johannisson, A., Rodriguez-Martinez, H. (2003). Subtle Membrane Changes in Cryopreserved Bull Semen in Relation with Sperm Viability, Chromatin Structure, and Field Fertility. *Theriogenology*, 60(4), 743 – 758.

Januskauskas, A., Haard, M. G., Haard, M. C., Soderquist, L., Lundeheim, N., Rodriguez-Martinez, H. (1996). Estimation of Sperm Viability in Frozen-Thawed Semen from Swedish A.I. Bulls. *Zentralbl Veterinarmed A*, 43(5), 281 – 287.

Johnston, S. D., (1991). Performing a Complete Canine Semen Evaluation in a Small Animal Hospital. *Veterinary Clinics of North America*, 21(3), 545 – 551.

Johnstone, S. D. (1984). Electroejaculation in the Domestic Cat. *Australian Veterinary Journal*, 61(5), 155 – 158.

Johnston, L. A., Donoghue, A. M., O'brien, S. J. & Wildt, D. E. (1991a). Rescue and maturation in vitro of follicular oocytes collected from nondomestic felid species. *Biology of Reproduction*, 45(6), 898 – 906.

Johnston, L. A., Donoghue, A. M., O'Brien, S. J., Wildt, D. E. (1991b). Culture Medium and Protein Supplementation Influence In Vitro Fertilization and Embryo Development in the Domestic Cat. *Journal of Experimental Zoology*, 257(3), 350 – 359.

Jorgenson, J. P. & Redford, K. H. (1993). Humans and Big Cats as Predators in the Neotropics. *Symposia of the Zoological Society of London*, London, 367 – 390.

Katsoff, D., Check, M. L., Check, J. H. (2000). Evidence that Sperm With Low Hypoosmotic Swelling Scores Cause Embryo Implantation Defects. *Archives of Andrology*, 44(3), 227 – 230.

Leite, M. R. P. (2000). *Relações Entre a Onça-Pintada, Onça-Parda e Moradores Locais em Três Unidades de Conservação da Floresta Atlântica do Estado do Paraná, Brasil*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil

Lindzey, F. 1987. Mountain lion. In: M. Novak, J. Baker, M. Obbard, B. Malloch (eds), *Wild Furbearer Management and Conservation in North America* (pp. 656-668). Toronto: Ministry of Natural Resources.

Lindzey, F. G., Ackerman, B. B., Barnhurst, D., Hemker, T. P., & Laing, S.P. (1994). Cougar Population Dynamics in Southern Utah. *Wildlife Society Bulletin*, 58(4), 619 – 623.

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.

Logan, K. A., Sweanor, L. L. (2001). *Desert Puma: Evolutionary Ecology and Conservation of an Enduring Carnivore*. Washington, D.C: Island Press,.

Logan, K. A., L.L. Sweanor, T.K. Ruth, And M.G. Hornocker. (1996). *Cougars of the San Andres Mountains*. Final Report, Federal Aid in Wildlife Restoration Project W-128-R, New Mexico Game and Fish, Santa Fe.

Loi, P., Ptak, G., Borboni, B., Fulka, J., Cappai, P., Clinton, M. (2001). Genetic Rescue of an Endangered Mammal by Cross-Species Nuclear Transfer Using Post-Mortem Somatic Cells. *Nature Biotechnology*. 19(10), 962 – 964.

Luvoni, G. C., Kalchschmidt, E., Leoni, S., Ruggiero, C. (2003). Conservation of Feline Semen Part I: Cooling and Freezing Protocols. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 5(4), 203–208.

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, Brasil: Fundação Biodiversitas.

Mazur, P. (1984). Freezing of Living Cells: Mechanisms and Implications. *American Journal of Physiology*, 247(3), C125–C142.

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(1), 249 – 258.

Miotto, R.A. (2006). *Análise de DNA Fecal para a Determinação da Presença e do Número Populacional Mínimo de Onças-Pardas (Puma concolor, Felidae) em Duas Unidades de Conservação do Estado de São Paulo, o Parque Estadual do Vassununga e a Estação Ecológica de Jataí*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brasil.

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., Crichton, E. G., Paz, R. C. R., Zuge, R. M., Moura, C. A., Nunos, A. V. L., et al. (2000). Ovarian Stimulation and Successful In Vitro Fertilization in the Jaguar (*Panthera onca*). (Abstract). *Theriogenology*, 53(1), 339.

Munson, L., Brown, J.L., Bush, M., Packer, C., Janssen, D., Reiziss, S. M., Wildt, D.E. (1996). Genetic Diversity Affects Testicular Morphology in Free-Ranging Lions (*Panthera Leo*) of Serengeti Plains and Ngorongoro Crater. *Journal of Reproduction and Fertility*, 108, 11 – 15.

Murphy, K. M. (1998). *The Ecology of the Cougar (Puma concolor) in the Northern Yellowstone Ecosystem: Interactions with Prey, Bears, and Humans*. Ph.D. dissertation, University of Idaho, Moscow.

Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Fonseca, G.A.B., Kent, J. (2000). Biodiversity Hotspots for Conservation Priorities. *Nature*, 403, 853 – 858.

Neild, D. M., Gadella, B. M., Chaves, M. G., Miragaya, M. H., Colembrander, B., Aguero, A. (2003). Membrane Changes During Different Stages of a Freeze-Thaw Protocol for Equine Semen Cryopreservation. *Theriogenology*, 59(8), 1693 – 1705.

Neild, D. M., Chaves, M. G., Flores, M., Miragaya, M. H., Gonzalez, E., Agüero, A. (2000). The HOS Test and its Relationship to Fertility in the Stallion. *Andrologia*, 32(6), 351 – 355.

Nelson, K. L., Crichton, E. G., Doty, L., Volenec, D. E., Morato, R. G., Pope, C. E., et al. (1999). Heterologous and Homologous Fertilizing Capacity of Cryopreserved Felid Sperm: a Model for Endangered Species. (Abstract). *Theriogenology*, 51, 290.

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, 1517–1524.

Internacional Union for Nature Conservaion - IUCN/SSC Cat Specialist Group. (1996). *Status Survey and Conservation Action Plan Wild Cats* (Nowell, K., Jackson, P. Comp. & Ed.). Gland, Switzerland: Author.

O'brien, S.J. (1977). The Family Life – the Human Cat Connection. *National Geographic*, 77 – 85.

O'brien, S. J., Martenson, J. S., Packer, C., Herbst, L., De Vos, V., Joslin, P., et al. (1987). Biochemical Genetic Variation in Zoo Geographic Isolates of African and Asiatic Lions. *National Geographic Res*, 3, 114 – 124.

O'brien, M.K., D.R. Mcculloch. (1985). Survival of Black-Tailed Deer Following Relocation in California. *Journal of Wildlife Management*, 49(1), 115 – 119.

Ohki S., Doyle D., Flanagan, T. D., Hiu, S. W., Mayhew, E. (Ed.) (1988). *Molecular Mechanisms of Membrane Fusion*. New York: Plenum.

Oliveira, T.G., Cassaro, K. (1999). *Guia de Identificação de Felinos Brasileiros* (2nd Ed.). São Paulo, Brasil: Sociedade de Zoológicos do Brasil.

Oettlé, E. E. (1993). Sperm Morphology and Fertility in the Dog. *Journal of Reproduction and Fertility*, 47, 257 – 260 (Suppl.).

Patil, S.B., Jayaprakash, D. And Shivali, S. (1998). Cryopreservation of Semen of Tigers and Lions: Computerized Analysis of the Motility Parameters of the Spermatozoa. *Current Science*, 75, 930 – 936.

Peña-Martínez, A. I. (2004). Canine Fresh and Cryopreserved Sêmen Evaluation. *Animal Reproduction Science*, 82 – 83, 209 – 224.

Peña-Martínez, 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(1), 163 – 174.

Pesch, S., Bergmenn, 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. *American Journal of Veterinary Research*, 45(5), 1038 – 41.

Platz, C. C., Wildt, D. E., Seager, S. 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. (2000). Embryo Technology in Conservation Efforts for Endangered Felids. *Theriogenology*, 53(1), 163 – 174.

Pope, C. E., Keller, G. L., Dresser, B. L. (1993). In Vitro Fertilization in Domestic and Nondomestic Cats Including Sequences of Earley Nuclear Events, In Vitro Development,

Cryopreservation and Successful Intra and Interspecies Embryo Transfer. *Journal of Reproduction and Fertility*, 47, 189 – 201 (Suppl.).

Pope, C. E., Turner, J. L., Quatman, S. P., Dresser, B. L. (1991). Semen Storage in the Domestic Felid: a Comparison of Cryopreservation Methods and Storage Temperature. (Abstract). *Biology of Reproduction*, 44(1), 117.

Paquet, P. C., A. Hackman. (1995). Large Carnivore Conservation in The Rocky Mountains: A Long-Term Strategy for Maintaining Freeranging and Self-Sustaining Populations of Carnivores. *World Wildlife Fund Canada*, Toronto, Ontario.

Purse, V. G., Johnson, L. A., Schulmann, L. L.. (1972). Loss of Boar Sperm Fertilizing Capacity Associated With Altered Acrosome Morphology During In Vitro Storage. *VII International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination*, Munich, 3, 1525 – 1600.

Pukazhenth, B. S., Neubauer, K., Jewgenow, K., Howard, J., Wildt, D. E. (2006). The Impact and Potential Etiology of Teratospermia in the Domestic Cat and its Wild Relatives. *Theriogenology*, 66, 112 – 121.

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., Noiles, E., Pelican, K., Donoghue, A., Wildt, D. E., Howard, J. G. (2000). Osmotic Effects on Feline Spermatozoa from Normospermic Versus Teratospermic Donors. *Cryobiology*, 40, 139 – 50.

Pukazhenth, B., Pelican, K., Wildt, D. E., Howard, J. G. (1999). Sensitivity of Domestic Cat (*Felis Catus*) Sperm from Normospermic Versus Teratospermic Donors to Cold-Induced Acrosomal Damage. *Biology of Reproduction*, 61, 135 – 141.

Redford, K. H. (1997). A Floresta vazia. In Valladares Padua, C.; Bodmer, R.E.; Cullen Jr., L., *Manejo e conservação de vida silvestre no Brasil* (Cap. 1:1-22). Brasília Cnpq/Belém, PA: Sociedade Mamiraua.

Redford, K.H.; Eisenberg, J.F. (1992). *Mammals of the Neotropics. Vol.2: The southern cone*. Chicago: University Chigago Press.

Riley, S.J. (1998). *Integration of Environmental, Biological, and Human Dimensions for Management of Mountain Lions (Puma Concolor) in Montana*. Dissertation - Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Doctor of Philosophy, Cornell University, Cornell, USA.

Riley, S.J., Nesslage, G.M., Maurer, B.A. (2004). Dynamics of Early Wolf and Cougar Eradication Efforts in Montana: Implications for Conservations. *Biological Conservation*, 119(4), 575 – 579

Ross, P.I., Jalkotzy, M.G. (1992). Characteristics of a Hunted Population of Cougars in South-Western Alberta. *The Journal of Wildlife Management*, 56(3), 417 – 426.

Roth, T. L., Armstrong, D. L., Barrie, M. T., Wildt, D. E. (1997). Seasonal Effects on Ovarian Responsiveness to Exogenous Gonadotrophins and Successful Artificial Insemination in the Snow Leopard (*Uncia uncia*). *Reproduction, Fertility and Development*, 9(3), 285 – 295.

Russell, L. D. (1991). The Perils Of Sperm Release—“Let My Children Go”. *International Journal of Andrology*, 14(5), 307 – 311.

Ruth, T. K., Logan, K.A., Sweanor, L., Hornocker, M. G. & Temple, L. J. (1998). Evaluating Cougar Translocation in New Mexico. *The Journal of Wildlife Management*, 62(4), 1264 – 1275.

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.

Scott, M. A., (2000). A Glimpse at Sperm Function In Vivo: Sperm Transport and Epithelial Interaction in the Female Reproductive Tract. *Animal Reproduction Science*, 60 – 61, 337 – 348.

Seidensticker, J. C. Iv, M. G., Hornocker, W. V., Wiles, & Messick. J. P. (1973). Mountain Lion Social Organization in the Idaho Primitive Area. *Wildlife Monograph*, 35, 3 – 60.

Sharpe , M. (1994). Regulation of Spermatogenesis. In: Knobil, E., Neill, J. D. (Eds.), *The Physiology of Reproduction* (1363 – 1434). New York: Raven Press.

Shaw, H. G. (1987). *Mountain Lion: Field Guide* (Special Report, 9, 3rd Printing). Arizona: Arizona Game & Fish.

Silveira, L. (1999). *Ecologia e Conservação dos Mamíferos Carnívoros no Parque Nacional das Emas*. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Goiás, Goiás, Brasil.

Sjoblom, P., Coccia, E. (1989). On the Diagnostic Value of the Hypoosmotic Sperm Swelling Test in an In Vitro Fertilization Program. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 6(1), 41 – 43.

Smith, K. D.; Rodriguez-Rigau, L. J.; Steinberger, E. (1977). Relation Between Indices of Semen Analysis and Pregnancy Rate in Infertile Couples. *Fertility and Sterility*, 28(12), 1314 – 1319.

Sojka, N. J., Jennings, L. L. (1970a). Collection and Utilization of Cat Semen for Artificial Insemination. *Journal of American Veterinary Medicine Association*, 156, 1250 – 1251.

Sojka, N. J., Jennings, L. L., Hamner, C. E. (1970b). Artificial Insemination in the Cat (*Felis catus*). *Laboratory Animal Care*, 20(2), 198 – 204.

Soulé, M. E., Terborgh, J. (1999). Protecting Nature at Regional and Continental Scales: a Conservation Biology Program for the New Millennium. *Bioscience*, 49, 809 – 817.

Spreadbury, B.R., Musil, K., Musil, J., Kaisner, C., & Koviak, J. (1996). Cougar Population Characteristics in Southeastern British Columbia. *Journal of Wildlife Management*, 60(4), 962 – 969.

Spungin, B., Margalit, I., Breitbart, H. (1995). Sperm Exocytosis Reconstructed in a Cell Free System. Evidence for the Involvement of Phospholipase C and Actin Filaments in Membrane Fusion. *Journal of Cell Science*, 108(6), 2525 – 2535.

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.

Stornelli, M. A. (2007). Evaluación de Semen en el Gato Doméstico: Análisis de Rutina y Metodologías Especiales Felino. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 31(1), 135 – 140.

Swanson, F. W. (1998). *Curso de Extensão – Felinos Selvagens, Biotécnicas Reprodutivas e Conservação*. Curitiba, Brasil: Setor de Ciências Biológicas, UFPR.

Swanson, W.F., Brown, J.L. (2004). International Training Programs in Reproductive Sciences for Conservation of Latin American Felids. *Animal Reproduction Science*, 82-83, 21 – 34.

Swanson, W. F., Johnson, W. E., Cambre, R. C., Citino, S. B., Quigley, K. B., Brousset, D. M., et al. (2003). Reproductive Status of Endemic Felid Species in Latin American Zoos and Implications for *Ex Situ* Conservation. *Zoo Biology*, 22(5), 421 – 441.

Swanson, W.F., Paz, R. C. R., Morais, R. N., Gomes, M. L. F., Moraes, W., Adania, C. H. (2002). Influence of Species and Diet on Efficiency of In Vitro Fertilization in Two Endangered Brazilian Felids – the Ocelot (*Leopardus pardalis*) and Tigrina (*Leopardus tigrinus*). *Theriogenology*, 57, 593.

Swanson, W.F., Howard, J.G., Roth, T.L., Brown, J.L., Alvarado, T., Burton, M., et al. (1996a). Responsiveness of Ovaries to Exogenous Gonadotrophins and Laparoscopic Artificial Insemination with Frozen-Thawed Spermatozoa in Ocelots (*Felis pardalis*). *Journal of Reproduction and Fertility*, 106(1), 87 – 94.

Swanson, W. F., Roth, T. L., Blumer, E., Citino, S. B, Kenny, D., Wildt, D. E. (1996b). Comparative Cryopreservation and Functionality of Spermatozoa from the Normospermic Jaguar (*Panthera onca*) and Teratospermic Cheetah (*Acinonyx jubatus*). (Abstract). *Theriogenology*, 45, 241.

Sweaner, L. L., Logan, K. A., And Hornocker, M. G. (2000). Cougar Dispersal Patterns, Metapopulation Dynamics, and Conservation. *Conservation Biology*, 14(3), 798 – 808.

Sweaner, L., Logan, K., & Hornocker, M. (1996). Cougar Social Organization. In: Logan, K.A, L.L. Sweaner, T.K. Ruth, & M.G. Hornocker, *Cougars of the San Andres Mountains* (Chapter 4). New Mexico Game and Fish, Santa Fe: Final Report, Federal Aid in Wildlife Restoration Project W-128-R.

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, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, São Paulo, Brasil.

Terborgh, J., Estes, J. A., Paquet, P., Ralls, K., Boyd-Heger, D., Miller, B. J. (1999). Role of Top Carnivores in Regulating Terrestrial Ecosystems. In: Soulé, M. E. & Terborgh, J. (Eds), *Continental conservation: scientific foundations for regional conservation networks* (Cap. 3). Washington, Island.

Thomassen, R., Sanson, G., Krogenaes, A., Fougner, J. A., Andersen Berg, K., et al. (2006). Artificial Insemination with Frozen Semen in Dogs: a Retrospective Study of 10 Years Using a Non-Surgical Approach. *Theriogenology*, 66(6-7), 1645 – 1650.

Thundathil, J. R., Meyer, A., Palasz, T., Barth, A. D., Mapletoft, R. J. (2000). Effect of The Knobbed Acrosome Defect in Bovine Sperm on IVF and Embryo Production. *Theriogenology*, 54(6), 921 – 934.

Thundathil, J. R., Gil, J., Januskauskas, A., Larsson, B., Soderquist, L., Mapletoft, R., et al. (1999). Relationship Between the Proportion of Capacitated Spermatozoa Present in Frozen-Thawed Bull Semen and Fertility with Artificial Insemination. *International Journal of Andrology*, 22(6), 366 – 373.

Tsutsui, T., Tanaka, A., Nakagawa, K., Fujimoto, Y., Murai, M., Anzai, M., et al. (2000). Unilateral Intrauterine Horn Insemination of Frozen Semen in Cats. *Journal of Veterinary Medicine Science*, 62(12), 1247 – 1251.

Vidolin, G.P. (2004). *Aspectos Bioecológicos de Puma concolor (Linnaeus, 1771), Leopardus pardalis (Linnaeus, 1758) e Leopardus tigrinus (Schreber, 1775) na Reserva Natural Salto Morato, Guaraqueçaba, Paraná, Brasil*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil.

Watson, P. F. (2000). The Causes of Reduced Fertility with Cryopreserved Semen. *Animal Reproduction Science*, 60-61, 481 – 492.

Watson, P. F. (1995). Recent Developments and Concepts in the Cryopreservation of Spermatozoa and the Assessment of Their Post-Thawing Function. *Reproduction, Fertility and Development*, 7(4), 871 – 891.

Watson, P. F. (1979). The Preservation of Semen in Mammals. *Oxford Reviews of Reproductive Biology*, 1, 283 – 350.

Weaver, J.L., Paquet, P.C., Ruggiero, L.F. (1996). Resilience and Conservation of Large Carnivores in the Rocky Mountains. *Conservation Biology*, 10(4), 964 – 976.

Weckerly, F. W. (1998). Sexual-Size Dimorphism: Influence of Mass and Mating Systems in the Most Dimorphic Mammals. *Journal of Mammalogy*, 79, 33 – 52.

Wildt, D. E. (1991). Fertilization in Cats. In: Dunbar, B. S., O'rand, M. (Eds.), *A Comparative Overview of Mammalian Fertilization*. New York: Plenum Publishing Corporation.

Wildt, D. E. (1990). Potencial Applications of IVF Technology for Species Conservation. In: Bavister, B. D., Cummins, J., Roldan. E. R. S. (eds), *Fertilization in Mammals* (pp. 349 – 364). Serono Symposium, Norwell.

Wildt, D.E., Roth, T.L. (1997). Assisted Reproduction for Managing and Conserving Threatened Felids. *International Zoo Yearbook*, 35(1), 164-172.

Wildt, D. E., Brown, J. L., Bush, M., Barone, M. A., Cooper, K. A., Grisham, J., Howard, J. G. (1993). Reproductive Status of Cheetahs (*Acinonyx Jubatus*) in North American Zoos: the Benefits of Physiological Surveys for Strategic Planning. *Zoo Biology*, 12(1), 45 – 80.

Wildt, D.E.; Monfort, S.L.; Donoghue, A.M.; Johnton, La.; Howard, J.G. (1992a). Embryogenesis in Conservation Biology - or How to Make an Endangered Species Embryo. *Theriogenology*, 37(1), 161 – 184.

Wildt, D. E., Donoghue, A. M., Johnston, L. A., Schmidt, P. M., Howard, J. G. (1992b). Species and Genetic Effects on the Utility of Biotechnology for Conservation. *Symposia of the Zoological Society of London*, 64, 45 – 61.

Wildt, D. E., Phillips, L. G., Simmons, L. G, Chakraborty, P. K., Brown , J. L., Howard , J. G., et al. (1988). A Comparative Analysis of Ejaculate and Hormonal Characteristics of the Captive Male Cheetah, Tiger, Leopard, and Puma. *Biology of Reproduction*, 38, 245 – 255.

Wildt, D. E., Bush, M., Goodrowe, K. L., Packer, C., Pusey, A. E., Brown, J. L., et al. (1987). Reproductive and Genetic Consequences of Fouding Isolated Lion Populations. *Nature*, 329(6137), 328 – 331.

Wildt, D. E., O'brien, S. J., Packer, C., Brown, J. L., Bush, M. (1986). Reproductive and Genetic Consequences of Founding an Isolated Population of East African Lions. *Biology of Reproduction*, 34, 203 (Suppl.).

Wildt, D. E., Chakraborty, P. K., Meltzer, D., Bush, M. (1984). Pituitary and Gonadal Response to LH Releasing Hormone Administration in the Female and Male Cheetah. *Journal of Endocrinology*, 101, 51 – 56.

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. *Biology Reproduction*, 29, 1019 – 1025.

Wood, T. C., Swanson, W. F., Davis, R. M., Anderson, J. E., Wildt, D. E. (1993). Functionality of Sperm From Normo- Versus Teratospermic Domestic Cats Cryopreserved in Pellets Or Straw Containers. (Abstract). *Theriogenology*, 39, 342.

Wozencraft, W.C. (1993). Order Carnivora. In Wilson, D.E. & Reeder, D.M. (eds.), *Mammal Species of the World* (2nd ed.) (279-348). Smithsonian Institution Press, Washington and London.

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

Zambelli, D., Cunto, M., Prati, F., Merlo, B. (2007). Effects of Ketamine or Medetomidine Administration on Quality of Electroejaculates Sperm and on Sperm Flow in the Domestic Cat. *Theriogenology*, 68, 796 – 803.

Zambelli, D., Merlo, B., Iacono, E., Prati, F. & Belluzzi, S. (2006). Fertilizing Ability of Electro-Ejaculated Cryopreserved Semen in the Domestic Cat. *Reproduction in Domestic Animals*, 41(2), 137 – 141.

Zambelli, D., Caneppele, B., Castagnetti, C., Belluzzi, S. (2002). Cryopreservation of Cat Semen in Straws: Comparison of Five Different Freezing Rates. *Reproduction in Domestic Animals*, 37(5), 310 – 313.

Zambelli, D., Belluzzi, S. (1998). Raccolta e Valutazione del Materiale Seminale di Gatto. *Praxis Veterinaria*, 1, 20 – 22.

Zavos, P. M. (1990). Hyposmotic Swelling Test (HOS)/ Functional Integrity of Sperm Membranes. *Journal of Assisted Reproduction Technology*, 2, 215 – 216.

3. AVALIAÇÃO ANDROLÓGICA DE PUMAS (*Puma concolor* LINNAEUS, 1771) ADULTOS, MANTIDOS EM CATIVEIRO.

RESUMO

O presente trabalho objetiva descrever um protocolo de coleta de sêmen por eletroejaculação e as características do ejaculado de pumas (*Puma concolor*) adultos, mantidos em cativeiro. Foram utilizados cinco pumas mantidos no Centro de Reabilitação de Animais Silvestres do Mato Grosso do Sul - CRAS/MS. Previamente à coleta foi realizada avaliação andrológica. O protocolo de eletroejaculação consistiu na aplicação um máximo de 4 séries de 10 estímulos com intervalos de 1 minutos entre as séries. Sendo todos os estímulos com a voltagem de 16 V As amostras coletadas foram avaliadas quanto ao seu aspecto físico(volume, vigor, motilidade espermática e concentração) e índice espermático, além da caracterização morfológica. Os animais apresentaram espículas penianas pequenas e uma média de comprimento da área de espículas de 8,21 mm. Apenas os pumas 3 e 4 apresentaram alterações na consistência testicular, sendo esta unilateral no puma 4. Todos os animais responderam ao procedimento de eletroejaculação com ereção peniana e ejaculação com volume variando de 0,4 a 0,5mL e concentração média de $205 \pm 141,77 \times 10^6$ sptz/mL. O vigor médio e a motilidade espermática média observada foi de $3,5 \pm 0,58$ e $75\% \pm 13$, respectivamente. O puma 3 apresentou um grau de degeneração testicular com qualidade seminal muito aquém dos demais animais, tal fato provavelmente associado ao estado de obesidade em que se encontrava o animal. O percentual médio das patologias totais foi de $53,88 \pm 15,50$ com destaque para cauda fortemente dobrada ou enrolada ($29,13 \pm 13,70$), cauda dobrada ou enrolada ($8,13 \pm 2,10$) e cauda enrolada na cabeça ($6,63\% \pm 5,34$). O protocolo proposto para coleta de semen em pumas adultos mantidos em sistema de cativeiro mostrou-se eficiente, com obtenção de ejaculados livres de contaminação com urina e com boas concentrações. Este trabalho demonstra ainda, que, assim como descrito pra outros felinos, os pumas apresentam grandes variações individuais nas características de seus ejaculados.

Palavras chave: Morfologia espermática, sêmen, puma.

ANDROLOGIC EVALUATION OF ADULT CAPTIVE COUGAR'S (*Puma concolor* LINNAEUS, 1771).

ABSTRACT

The aim of this study was describe the semen's collection protocol used for adult captive cougars (*Puma concolor*), and characterize the semen collected from those animals. Five adults captive adult cougars from The Mato Grosso do Sul's Wild Animal Rehabilitation Center (CRAS-MS) were used in this study. Before start the collection procedure an andrologic evaluation was made. The eletroejaculation protocol used consisted in 4 series of 10 stimuli with a interval of 10 min al af then with the intensity of 16 V. The samples were evaluated using the following parameters: physics aspects, volume, concentration, sperm progressive status, sperm motility, sperm motility index and according to morphology. The animals had small penile spikes and a medium of spikes area length of 8.21 mm. Only the cougars 3 and 4 showed alteration on the testicles consistency, and that was unilateral on the cougar 4. All animals react to the procedure with penile erection and ejaculated volume 0.4 to 0.5 ml and average concentration of $205 \pm 141.77 \times 10^6$ spz/m. The average sperm progressive status and the sperm motility analyzed were 3.5 ± 0.58 e $75\% \pm 13$, respectively. The cougar 3 showed some testicle degeneration degree with less spermatic quality than the other animals, which probably can be associated with its obesity. The average of structurally abnormal spermatozoa were $53,88\% \pm 15,50$ and the most frequent pathologies were tightly coiled or bent tail ($29.13\% \pm 13.70$), coiled or bent tail ($8.13\% \pm 2,10$) and tail coiled on the head ($6.63\% \pm 5,34$). The eletrejaculation protocol used for the collection of captive adult cougar's semen was efficient, with the obtention of samples free of urine and qith god concnetrations. This study can show that, as described for others felines, cougars have great individual variations in its ejaculate's characteristics.

Keywords: spermatic morphology, semen, cougar.

3.1. INTRODUÇÃO

O puma é o segundo maior felino do Brasil, perdendo apenas para a onça-pintada (*Panthera onca*). O peso é bastante variável, relatada uma amplitude de 25 a 70 kg (Redford & Eisenberg, 1992). Esta espécie possui ampla distribuição latitudinal ocorrendo em diversos habitats, desde o Canadá até o Chile, incluindo o Brasil (Redford & Eisenberg, 1992; Emmons & Feer, 1997). Esses animais são predadores oportunistas e sua dieta é composta por mamíferos, aves, répteis e invertebrados. Nos trópicos, presas de pequeno e médio porte são mais frequentes enquanto que na América do Norte a predação é preferencial sobre grandes ungulados (Miotto, 2006). Iriarte et al. (1990) sugeriram que o menor tamanho corporal das onças-pardas nos trópicos e a baixa taxa de predação de animais de grande porte estejam ligados à competição interespecífica desta espécie com a onça-pintada.

O puma é uma espécie territorialista e o tamanho da área de vida varia de 32 a 155 Km² no Pantanal (Crawshaw & Quigley, 1984) e 98 Km² no Parque Estadual do Morro do Diabo (Cullen, 1999). São carnívoros solitários e exibem comportamento de poligamia como estratégia reprodutiva, em que um macho dominante reproduz com fêmeas que se interpõem em seu território (Murphy, 1998).

A reprodução da onça-parda ocorre durante o ano todo, porém alguns autores relatam pulsos de nascimentos em certas épocas do ano (Anderson, 1983; Ross & Jalkotzy, 1992; Logan et al., 1996). O ciclo estral dura entre 13 e 33 dias em animais de vida livre (Logan et al., 1996) e o estro 8 dias (Anderson, 1983; Hansen, 1992; Oliveira & Cassaro, 1999). Segundo Anderson (1983) e Logan et al. (1996), o período de gestação tem duração média de 92 dias (variando de 84 a 98). Logan et al. (1996) observaram uma média de 3,0 a 3,4 filhotes por ninhada, enquanto que uma média de 3,1 foi observada por Spereadbury et al. (1996).

Os felinos silvestres estão entre as espécies mais ameaçadas do mundo sendo sua população afetada por fatores que variam localmente, seja pela descaracterização de habitats, disponibilidade de alimentos, forte pressão de caça ou baixa densidade populacional (IUCN, 1996). Esta é uma situação generalizada para a maioria dos predadores neotropicais, que influenciam na dinâmica de populações e conseqüentemente, no equilíbrio ecológico como um todo (Redford, 1997). Especificamente o puma é classificado como Vulnerável na Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção (IBAMA, 2003) e citada no apêndice II da CITES (CITES, 2009).

A conservação das espécies está intrinsecamente ligada à manutenção da variabilidade genética. Quando uma população é isolada geograficamente e fica sujeita à uniformidade genética, vários fatores se aliam para desencadear o processo de extinção. Entre estes fatores estão a maior susceptibilidade a doenças, o aumento de anormalidades espermáticas e diminuição da fertilidade, o desbalanceamento endócrino de hormônios reprodutivos afetando a espermatogênese e a ovulação e o aumento da morbidade e mortalidade perinatal (O'Brien & McCulloch, 1985; Wildt et al., 1987; Munson et al., 1996; Eizirik et al., 2001).

Estratégias de conservação objetivam manter e, se possível, aumentar a biodiversidade. A ação ideal para se alcançar este objetivo é preservar o hábitat da espécie (Wildt et al., 1997; Loi et al., 2001). Estratégias de conservação *in situ*, no entanto, nem sempre são suficientes para a propagação de pequenas populações e manutenção de uma adequada variabilidade genética (Comizzoli, et al., 2000). Assim, estratégias de conservação *ex situ* objetivam auxiliar na manutenção de uma população geneticamente viável por meio de estratégias de reprodução assistida e criopreservação de fontes genéticas (Andrabi & Maxwell, 2007). A coleta de amostras de sêmen é fundamental para a caracterização de parâmetros andrológicos espécie específicos, bem como para a utilização em programas de reprodução assistida. As amostras podem ser coletadas por meio de vagina artificial (Sojka & Jennings, 1970; Sojka et al., 1970; Zambelli & Belluzzi, 1998), eletroejaculação (Platz et al., 1978; Dooley et al., 1983; Johnstone, 1984; Howard et al., 1986) ou diretamente do epidídimo ou vasos deferentes (Howard et al., 1986; Axner, 1998). Segundo Howard (1993) A eletroejaculação é a técnica mais apropriada para animais silvestres, uma vez que pode ser realizada em animais anestesiados.

Além das avaliações subjetivas de vigor e motilidade espermáticas, a morfologia espermática é um parâmetro de avaliação *in vitro* de fácil acesso e de grande importância, uma vez que está intimamente correlacionada com casos de infertilidade (Oettlé, 1993). A condição de teratospermia é caracterizada quando há uma proporção menor que 40% de espermatozoides normais presentes no ejaculado (Pukazhenthil et al., 2001; Neubauer et al., 2004) e frequentemente está presente em ejaculados de felídeos, incluindo certos gatos domésticos, mas os mecanismos celulares e moleculares que provocam este fenômeno são desconhecidos (Neubauer et al., 2004). Pumas considerados teratospérmicos, porém, foram utilizados com sucesso em programas de fertilização *in vitro* (Miller et al., 1990). 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 (Oettlé, 1993).

Nesse sentido, o presente experimento objetiva a avaliação andrológica de pumas mantidos em sistema de cativeiro, por meio da descrição de um protocolo de coleta de sêmen bem como a caracterização física e morfológica do sêmen.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados cinco pumas machos, adultos, mantidos em condições de cativeiro no Centro de Reabilitação de Animais Silvestres do Mato Grosso do Sul (CRAS-MS). A presente experimentação foi submetida e aprovada pela Comissão de Ética do Departamento de Veterinária-UFV (registro nº 21/2008) e autorizada pelo IBAMA (processo nº 14561-1 de 17/04/2008).

- Coleta de sêmen e avaliação andrológica

Foi realizada uma coleta em cada animal. Para obtenção do sêmen, os animais foram contidos quimicamente pelo uso de dardos anestésicos e mantidos sob anestesia. Utilizou-se como protocolo anestésico a associação de cloridrato de quetamina e cloridrato de xilazina nas doses de 10 mg/kg e 1,2 mg/kg, respectivamente. Nos casos em que o animal não entrou em plano anestésico adequado uma dose reforço de 4 mg/kg de cloridrato de quetamina e 0,4 mg/kg de cloridrato de xilazina foi aplicada por via intramuscular. Os animais tiveram seus parâmetros vitais aferidos e avaliados, por um médico veterinário, durante e após o procedimento sendo monitorados até que conseguissem manter-se em estação, assegurando uma recuperação pós-anestésica segura.

Após a contenção química foi realizada a biometria corporal e testicular dos animais, utilizando-se fita métrica e paquímetro digital, e a pesagem dos animais. Foram mensurados para a biometria copórea: comprimento corporal (focinho até base da cauda); comprimento da cauda; altura de cernelha; altura de membro pélvico; diâmetro torácico; diâmetro cervical e largura e comprimento das patas de ambos membros. Para a biometria testicular foram considerados o comprimento, a largura e a espessura, assim como a prega dupla de pele de ambos os testículos. Para o cálculo do volume testicular foi descontado das mensurações o valor da prega dupla de pele, para se obter a mensuração exata do testículo. O volume dos

testículos foi calculado a partir da fórmula do elepsóide $v = 4/3 \times \pi \times C/2 \times L/2 \times E/2$, em que v representa o volume testicular, C o comprimento, L a largura e E a espessura, todos apresentados em centímetros (Figura 3.1). Utilizando-se o volume testicular, e considerando a densidade testicular (1) os valores obtidos de volume (mL) foram extrapolados para gramas para se calcular o índice gonadossomático, que se refere à massa corpórea alocada em massa testicular. A fórmula utilizada para o cálculo do índice gonadossomático (IGS) foi $IGS = (v_D + v_E) \times 100/ PC$, em que V_D representa o volume do testículo direito, V_E o volume do testículo esquerdo e PC o peso corporal do animal em gramas. Ao exame andrológico, avaliou-se a consistência testicular, classificada como firme, elástica, ligeiramente flácida, flácida e muito flácida e o comprimento da região ocupada pelas espículas e características das espículas do pênis (Figura 3.1).

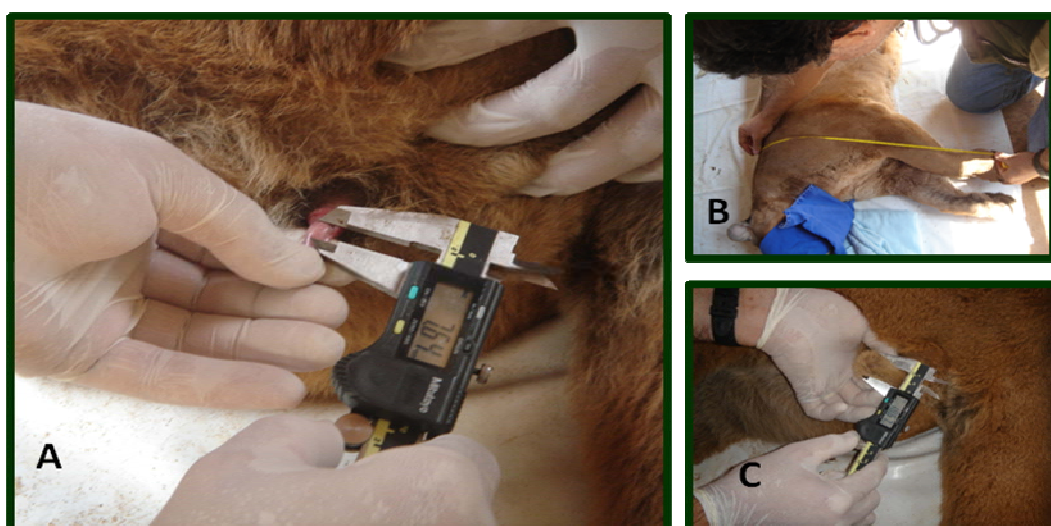


Figura 3.1: Procedimento de biometria da área de espículas (A), biometria corporal (B) e testicular (C) em pumas adultos mantidos em cativeiro.

Previamente à coleta de sêmen foi feito o esvaziamento da bexiga com sonda uretral 6 estéril e seringa de 10 mL e posterior lavagem da bexiga com solução fisiológica estéril a fim de evitar a contaminação da amostra com urina (Figura 3.2).



Figura 3.2: Procedimentos de coleta de urina e lavagem da bexiga realizados em pumas adultos mantidos em condições de cativeiro.

O sêmen foi coletado com auxílio de um aparelho de eletroejaculação à bateria, equipado com uma probe retal de 9 cm de perímetro, com três eletrodos longitudinais. A probe foi devidamente lubrificada e introduzida no reto do animal com as os eletrodos posicionados ventralmente sob leve pressão. O pênis foi exposto e aproximado a um tubo graduado (Eppendorf) previamente aquecido a temperatura de 38°C, o qual foi substituído a cada série de estímulos (Figura 3.3). Foram aplicados no máximo 4 séries de 10 estímulos de 16 V com intervalos de 1 minuto entre as séries. Cada estímulo durou aproximadamente 1 segundo para ir de 0V à 16V, permanecendo por 2 a 3s, seguido por um retorno abrupto a 0V, sendo o intervalo entre os estímulos de 2 a 3s. Para uma aferição mais precisa do volume do ejaculado, utilizou-se uma micropipeta de volume ajustável.



Figura 3.3: Procedimento de coleta de sêmen em pumas adultos mantidos em condições de cativeiro. Lubrificação da probe (A), posição correta para inserção da probe no reto do animal (B) e aplicação do estímulo (C), com a extensão dos membros pélvicos durante a aplicação do estímulo (D).

-Avaliação espermática

Após as coletas, os ejaculados foram analisados quanto aos aspectos físicos (volume e cor). Imediatamente após esta análise, uma gota do sêmen foi colocada em uma lâmina que foi coberta com lamínula, ambos previamente aquecidos a 38° C, a fim de evitar choque térmico. Em seguida, sob aumento de 100x ao microscópio de luz monocular portátil (Handycope[®]), o material foi avaliado quanto à motilidade espermática progressiva e ao vigor, este numa escala de zero a cinco. Posteriormente, estes valores foram utilizados no cálculo do índice espermático ($IE = [M + (Vi \times 20)]/2$, em que M representa a motilidade e Vi o vigor espermático) que consiste na média entre vigor e motilidade espermática na qual ambos têm a mesma significância (Howard et al., 1993).

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 pipetada uma alíquota de 10 μ L e avaliados os parâmetros de vigor e motilidade espermática, como descrito anteriormente, aguardou-se um tempo para que os espermatozoides morressem para se proceder a contagem dos mesmos na área determinada. A concentração da solução equivale à quantidade de espermatozoides contabilizados multiplicado por 10^6 . A partir destes valores foi calculado o total de espermatozoides por ejaculado ($sptz/ejaculado = volume \times concentração$) e o total de espermatozoides móveis por ejaculado ($sptz \text{ móveis}/ejaculado = volume \times concentração \times motilidade / 100$).

Para a avaliação das características morfológicas dos espermatozoides utilizou-se uma alíquota de sêmen descongelado, esta foi colocada em formol salino tamponado e observada em microscópio de contraste de fase sob um aumento de 1000x, sendo computadas 200 células de cada amostra de sêmen. Foi computada uma patologia por espermatozoide e as patologias foram classificadas de acordo com recomendações do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal - CBRA (CBRA, 1998)

Os dados avaliados foram descritos quanto à média e respectivo desvio padrão, por meio da função estatística do programa Excel Windows XP.

3.3. RESULTADOS

Os animais apresentaram peso corporal variando de 48,25 a 80 Kg, com comprimento corporal médio de 133 cm e altura cernelha de 67,8 cm. Os demais dados biométricos observados estão sumariados na tabela 3.1.

Tabela 3.1: Características biométricas corpóreas de pumas adultos mantidos em condições de cativeiro.

Dados biométricos	Puma 1	Puma 2	Puma 3	Puma 4	Puma 5	Média \pm DP (Coef. Var.)
Peso (Kg)	49,15	48,25	80	48,45	48,50	54,87 \pm 14,05 (25,61)
Biometria corporal (cm)						
Comprimento (focinho-cauda)	130	137	135	135	128	133 \pm 3,81 (2,86)
Comprimento cauda	64	58	62	65	65	62,80 \pm 2,95 (4,70)
Altura de cernelha	68	66	68	69	68	67,80 \pm 1,10 (1,62)
Altura membro pélvico	64,50	68	70,50	70	71	68,80 \pm 2,66 (3,87)
Diâmetro torácico	75	74,50	99	74	75	79,50 \pm 10,91 (13,72)
Diâmetro cervical	49	45	49	45	45	46,60 \pm 2,19 (4,70)
Largura pata - membro torácico	8,50	8,50	8,50	8,50	8,50	8,50 \pm 0,00 (0,00)
Comprimento pata – membro torácico	9	8	8,50	7,50	9	8,40 \pm 0,65 (7,76)
Largura pata - membro pélvico	8	7	7,50	6,50	7	7,20 \pm 0,57 (7,92)
Comprimento pata – membro pélvico	9	8	8	7,30	7,70	8,00 \pm 0,63 (7,86)

O volume testicular médio observado foi de 7,6 mL para o testículo direito e 7,5 mL para o testículo esquerdo, perfazendo um total de 15,1 mL em ambos os testículos, o que define um investimento de cerca de 0,03% do peso corporal alocado em gônadas (índice gonadossomático) (Tabela 3.2). Os demais dados biométricos testiculares, assim como a consistência testicular e as características das espículas penianas (Figura 3.5) estão demonstrados na tabela 3.2.

Tabela 3.2: Biometria testicular, índice gonadossomático e características das espículas de pumas adultos mantidos em condições de cativeiro.

Parâmetros	Puma 1	Puma 2	Puma 3	Puma 4	Puma 5	Média \pm DP (Coef. Var.)	
Biometria testicular							
Testículo direito	Comprimento (mm)	34,60	34,60	27,30	38,30	33,10	33,58 \pm 4,00 (11,91)
	Largura (mm)	23,30	26,60	19,80	24,70	25	23,88 \pm 2,56 (10,74)
	Espessura (mm)	27	29	22,90	28	26,20	26,62 \pm 2,33 (8,76)
	Volume testicular (mL)	7,67	9,92	4,32	9,13	6,92	7,59 \pm 2,18 (28,70)
Testículo esquerdo	Comprimento (mm)	35,20	33,70	27,30	33	33,70	32,58 \pm 3,06 (9,39)
	Largura (mm)	24,40	24,60	21,70	24,40	23	23,62 \pm 1,25 (5,29)
	Espessura (mm)	28,90	29,80	24,50	28,60	26,40	27,64 \pm 2,15 (7,80)
	Volume testicular (mL)	8,91	9,09	5,19	7,81	6,44	7,49 \pm 1,66 (22,23)
Prega cutânea (mm)	3,40	3,20	2,90	3,80	4,20	3,50 \pm 0,51 (14,57)	
Índice gonadossomático (%)	0,03	0,04	0,01	0,03	0,03	0,03 \pm 0,01 (36,35)	
Consistência testicular	firme	firme	flácida	testículo esquerdo levemente mais firme	firme	..	
Comprimento da região com espículas (mm)	8,20	8	7,55	10	7,30	8,21 \pm 1,06 (12,94)	
Característica de espículas	pequenas	pequenas	pequenas	pequenas	pequenas	..	



Figura 3.4: Características das espículas penianas de pumas adultos mantidos em condições de cativeiro.

O protocolo de eletroejaculação mostrou-se eficiente em 100% dos animais, não havendo contaminação com urina em nenhuma das coletas. O volume de sêmen coletado variou de 0,4 a 0,5 mL, com uma concentração média de 205×10^6 por mililitro de sêmen, apresentando em média vigor espermático de 3,5 e motilidade espermática de 75%. Os demais parâmetros são demonstrados na tabela 3.3.

Tabela 3.3: Volume do ejaculado e características do sêmen de pumas adultos mantidos em condições de cativeiro.

Animal	Puma 1	Puma 2	Puma 4	Puma 5	Média \pm DP (Coef. Var.)	Puma* 3
Volume total (mL)	0,40	0,50	0,50	0,40	$0,45 \pm 0,06$ (12,83)	0,40
Concentração espermática (sptz $\times 10^6$ /mL)	180	400	60	180	$205 \pm 141,77$ (69,16)	5
Total de espermatozoides por ejaculado ($\times 10^6$)	72	200	30	72	$93,50 \pm 73,71$ (78,83)	2
Motilidade espermática (%)	60	70	90	80	$75\% \pm 13$ (17,21)	10
Vigor (0-5)	3	3	4	4	$3,50 \pm 0,58$ (16,50)	1
Índice espermático (%)	60	65	85	80	$72,50 \pm 11,90$ (16,42)	15
Espermatozoides móveis/ ejaculado ($\times 10^6$)	43,20	140	27	57,60	$66,95 \pm 50,28$ (75,10)	0,20

*Animal 3 apresentou qualidade espermática muito aquém dos demais animais, não sendo computado na média geral.

Quanto aos aspectos morfológicos, o sêmen de puma apresentou média de 46,13% de espermatozóides normais, sendo que as patologias mais comumente observadas foram: cauda fortemente dobrada ou enrolada, cauda dobrada ou enrolada e cauda enrolada na cabeça, e as patologias menos observadas foram estreito na base, cabeça isolada normal e acrossoma ausente (Tabela 3.4). Devido aos valores indesejáveis de vigor, motilidade e concentração do sêmen coletado do puma 3, este não foi avaliado quanto à morfologia.

Tabela 3.4: Patologias espermáticas observadas em sêmen descongelado de pumas adultos mantidos em condições de cativeiro.

Patologia (%)	Puma 1	Puma 2	Puma 4	Puma 5	Média \pm DP (Coef. Var.)
Espermatozóides patológicos	58,5	50	72	35	53,88 \pm 15,50 (28,78)
Espermatozóides normais	41,5	50	28	65	46,13 \pm 15,50 (33,61)
Patologias de Cabeça					
Acrossoma Ausente	0	0	0	1,5	0,38 \pm 0,75 (200,00)
Estreita na base	1	0	0	0	0,25 \pm 0,50 (200,00)
Contorno anormal	1	0,5	1,5	1	1 \pm 0,41 (40,82)
Cabeça Isolada normal	1	0	0	0	0,25 \pm 0,5 (200,00)
Formas teratológicas	0,5	2	0	1	0,88 \pm 0,85 (97,59)
Patologias de cauda					
Cauda enrolada na cabeça	3	9	13	1,5	6,63 \pm 5,34 (80,67)
Cauda dobrada ou enrolada	9	5	9,5	9	8,13 \pm 2,10 (25,80)
Fortemente dobrada ou enrolada	31	25,5	46,5	13,5	29,13 \pm 13,70 (47,02)
Gota protoplasmática distal	1,5	1,5	0	0	0,75 \pm 0,87 (115,47)
Gota protoplasmática proximal	0,5	1	0	0	0,38 \pm 0,48 (127,66)
Patologias de peça intermediária					
Fratura	4	1	1	2	2 \pm 1,41 (70,71)
Edema	0	1	0	1	0,5 \pm 0,58 (115,47)
Dag defect	1,5	0	0	4,5	1,5 \pm 2,12 (141,42)
Gigante, curto, largo, pequeno, normal	4,5	3,5	0,5	0	2,13 \pm 2,21 (104,12)

3.4 DISCUSSÃO

Os pumas avaliados no presente experimento apresentaram peso médio corporal de 54,87 Kg, dentro da amplitude normal para a espécie (Redford & Eisenberg, 1992). Porém o animal três apresentou peso e diâmetro torácico muito acima da média dos demais animais, sendo considerado obeso para a espécie. O comprimento corporal (focinho-cauda) variou de 128 a 137 cm e média de altura de cernelha de 67,80 cm, com baixa variação entre os animais.

As espículas no pênis são características exclusivas dos felinos, e por serem andrógeno dependentes, podem ser utilizadas como preditor da capacidade androgênica individual. No presente experimento observou-se que todos os animais possuíam espículas penianas com aspectos semelhantes e embora pequenas quando comparadas a outras espécies de felinos, como a jaguatirica, foram consideradas características para pumas adultos.

O avanço no conhecimento sobre fisiologia e morfologia dos animais silvestres, especialmente os grandes felinos, esbarra na dificuldade do acesso a esses animais, dado a raridade dos mesmos e a complexidade em seu manejo e cada oportunidade de contenção deve ser aproveitada para se obter a maior quantidade de informações sobre estes animais. Neste sentido, os dados de biometria corporal e biometria e características dos órgãos reprodutivos são apresentados nas tabelas 3.1 e 3.2.

A degeneração testicular é a principal causa de redução de fertilidade em espécie de mamíferos domésticos. Quando no início, a degeneração se apresenta com flacidez testicular e tamanho da gônada normal a levemente reduzido, em casos mais avançados o órgão se torna diminuído de volume, com consistência firme à palpação, resistente ao corte podendo até a ocorrer mineralização dos túbulos seminíferos. Dependendo da gravidade da lesão, o ejaculado pode conter baixa concentração espermática e elevada taxa de espermatozóides morfologicamente anormais, sendo que em casos mais graves pode ocorrer azospermia (Nascimento & Santos, 2003). Os testículos dos animais avaliados no presente experimento se apresentaram em geral com consistência elástica, exceto o puma 3, que apresentou testículos com consistência flácida e o puma 4 que apresentou o testículo esquerdo levemente mais firme.

O protocolo proposto para coleta de sêmen em puma mostrou-se eficiente, uma vez que todos os animais responderam com ereção peniana e ejaculação de amostras de sêmen turvas a translúcidas. O volume espermático, considerado como a soma das alíquotas coletadas

contendo espermatozóides, variou de 0,4 a 0,5 mL com concentração média de $205 \times 10^6 \pm 141,77$ espermatozóides/mL de ejaculado, obtendo-se, portanto uma média de $93,50 \times 10^6 \pm 73,71$ espermatozóides por ejaculado.

Wildt et al. (1988) coletaram ejaculados de puma com maior volume ($3,4 \text{ mL} \pm 0,6$), menor concentração ($22 \times 10^6 \pm 7,3$ spz/mL de ejaculado), e menos espermatozóides por ejaculado ($74,8 \times 10^6$ spz/ejaculado). Já Miller et al. (1990) obtiveram ejaculados com volume variando de 0,37 a 1,52 mL e concentração de 4 a 27×10^6 spz/mL, valor muito inferior ao do presente trabalho. Estas diferenças, no volume do ejaculado e em sua concentração, possivelmente ocorrem pois o protocolo convencional para coleta de sêmen de felinos baseia-se em uma grande quantidade de estímulos elétricos, através de eletrodo transretal, em intensidade crescente, sem o esvaziamento e lavagem prévia da bexiga. Esta técnica foi primeiramente descrita por Wildt et al. (1983) para coleta de sêmen de guepardos (*Acinonyx jubatus*) e tem sido utilizado como modelo para a coleta de sêmen em várias espécies de felinos selvagens como o tigre (*Panthera tigris*, Donoghue et al., 1990), onça parda (*Puma concolor*, Miller et al., 1990), jaguatirica (*Leopardus pardalis*, Swanson et al., 1996; Baudi, 2005), onça pintada (*Panthera onça*, Morato, 1998). Porém, na maioria destas espécies são relatadas baixas concentrações de espermatozóides, com freqüente contaminação com urina. Queiroz (2003) e Moraes et al. (2002) relataram que em jaguatiricas uma grande contaminação com urina é observada (69 a 75% das amostras coletadas), provocando redução na qualidade espermática e diluição do ejaculado. Em vista destes resultados, no presente estudo 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. A eletroejaculação baseia-se na estimulação dos nervos ligados aos órgãos reprodutores, inclusive as glândulas acessórias. Sendo assim, o maior volume e menor concentração encontrados utilizando os protocolos de coleta convencionais também podem estar relacionados ao excesso de estímulos a estas glândulas.

Os valores médios de vigor e motilidade obtidos no presente experimento foram de $3,5 \pm 0,58$ e $75\% \pm 13$, respectivamente. Os dados obtidos no animal número três foram descartados da média geral, uma vez que este apresentou um grau considerável de degeneração testicular, diagnosticados pela consistência flácida dos testículos e baixa motilidade espermática.

Em outros estudos com pumas, Wildt et al. (1988) observaram média de motilidade espermática inferior ao encontrado no presente estudo ($64,3\% \pm 6,6$) porém vigor médio semelhante ($3,6 \pm 0,2$), enquanto que Miller et al. (1990) obtiveram motilidade espermática variando de 40 a 50% e vigor entre 2,5 e 3 ambos inferiores aos encontrados no presente trabalho. O índice espermático considera ao mesmo tempo o vigor e a motilidade espermática, nos pumas avaliados o valor médio observado foi de $72,5\% \pm 11,9$, valores descritos na literatura para esta mesma espécie estão entre 50 e 68,15% (Wildt et al., 1988; Miller et al., 1990). Neste sentido, também a média de espermatozóides móveis por ejaculado foi superior no presente experimento ($66,95 \pm 50,28, \times 10^6$), aos descritos por Wildt et al. (1988) ($44,2 \times 10^6$) e por Miller et al. (1990) ($6,59 \times 10^6$).

A urina é tóxica aos espermatozóides e quando amostras de sêmen são contaminadas, durante o procedimento de eletroejaculação, os parâmetros de vigor e motilidade declinam drasticamente. Desta forma, possivelmente os reduzidos valores de índice espermático e total de espermatozóides móveis observados nos demais trabalhos com pumas, estão relacionados com contaminação dos esjaculados com urina durante a eletroejaculação, uma vez que os autores utilizaram protocolos convencionais de coleta de sêmen em felinos, sem o esvaziamento e lavagem da bexiga.

A média de espermatozóides morfológicamente patológicos observados no sêmen dos pumas estudados foi de $53,88\% \pm 15,50$, variando de 35 a 72%, ou seja, em pumas mantidos em cativeiro observa-se elevadas variações individuais entre as taxas de espermatozóides anormais. A média de espermatozóides morfológicamente anormais foi inferior à relatada por Wildt et al. (1988) de $73,5\% \pm 4,9$, por Miller et al., (1990) de 82 a 99% e por Pukazhenth et al., (2001) de 91,4%.

A condição de teratospermia é caracterizada como sendo uma porcentagem menor que 40% de espermatozóides normais presentes no ejaculado e freqüentemente está associada a ejaculados de felídeos, incluindo certos gatos domésticos (Pukazhenth et al., 2001; Neubauer et al., 2004). No presente experimento, apenas o puma 4 apresentou ejaculado com menos de 40% de espermatozóides morfológicamente normais, sendo assim, considerado como teratospérmico. Estudos *in vitro* mostraram correlações negativas entre a proporção de defeitos e a habilidade de penetração em oócitos, embora ejaculados com alta proporção de espermatozóides anormais possam apresentar boa fertilidade *in vivo* (Axnér & Linde-Forberg,

2002). São poucos os estudos que correlacionam morfologia espermática com fertilidade em felinos (Donoghue et al. 1992; Wildt et al. 1993; Axner et al., 1996, 1997, 1998). Em um estudo com gatos domésticos, Axner & Linde-Forsberg (2007) correlacionaram diferentes patologias com a fertilidade *in vivo*. Neste estudo, somente as patologias de cabeça foram relacionadas com baixa fertilidade, e em contraste com os resultados em bovinos (Barth & Oko, 1989), um animal com elevadas proporções de gota citoplasmática proximal se mostrou fértil. Em um estudo em pumas, Miller et al. (1990) observaram que mesmo ejaculados com elevada incidência de espermatozoides pleiomórficos foram capazes de fertilizar ovócitos maturados *in vitro*.

No presente estudo, as patologias mais frequentemente observadas foram cauda fortemente dobrada ou enrolada ($29,13\% \pm 13,70$), cauda dobrada ou enrolada ($8,13\% \pm 2,10$) e cauda enrolada na cabeça ($6,63\% \pm 5,34$). Wildt et al. (1988) registraram maiores porcentagens de peça intermediária dobrada com gota citoplasmática ($24\% \pm 6,5$), cauda fortemente enrolada ($20\% \pm 4,4$) e cauda fortemente dobrada sem gota citoplasmática ($11\% \pm 3,8$). Já Miller et al.(1990) observaram elevadas porcentagens de espermatozoides com cauda fortemente enrolada (18 a 66%).

A etiologia das anormalidades específicas assim como seu impacto sobre a fertilidade ainda são controversos (Howard et al., 1986; Wildt et al., 1987), porém, dificilmente espermatozoides com defeitos maiores na cabeça, danos acrossomais ou cauda fortemente dobrada, podem participar da fertilização (Wildt et al., 1988). Howard et al., (1993) observaram que a zona pelúcida representa uma barreira para espermatozoides com defeitos na cabeça e, segundo Thundathil et al. (2000), espermatozoides com acrossoma anormal não possuem capacidade de aderir ao ovócito *in vitro* e conseqüentemente não apresentam fertilidade.

3.5. CONCLUSÃO

O protocolo proposto para coleta de semen em puma (*Puma concolor*) adultos mantidos em sistema de cativeiro mostrou-se eficiente, com obtenção de ejaculados livre de contaminação com urina, em concentração e total de espermatozoides superiores ao relatado na literatura, sendo assim recomendado a ser utilizado em programas de reprodução assistida de pumas. O índice espermático observado nas amostras coletadas foi superior ao descrito na literatura na mesma espécie. Embora com altas taxas de espermatozoides pleiomórficos,

apenas um indivíduo dentre os pumas avaliados mostrou-se teratospérmico. As patologias mais frequentemente observadas foram cauda fortemente dobrada ou enrolada, cauda dobrada ou enrolada e cauda enrolada na cabeça.

3.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andrabi, S. M. H., Maxwell, W. M. C. (2007). A Review of Reproductive Biotechnologies for Conservation of Endangered Species. *Animal Reproduction Science*, 99(3-4), 223 – 243.

Anderson, A. E. (1983). A Critical Review of Literature on Puma (*Felis concolor*) (Special Report). *Denver: Colorado Division of Wildlife, Research Section*, 54(8), 1 – 92.

Axnér, E. (1998). Mating and Artificial Insemination in Domestic Cats. In: Simpson, G., England, G. C., Harvey, M. (eds), *British Small Animal Veterinary Association Manual of Small Animal Reproduction and Neonatology* (105 – 111). Cheltenham: BSVA.

Axnér, E., Ström-Holst, B., Linde-Forsberg, C. (1998). Morphology of Spermatozoa in the Cauda Epididymidis Before and After Electroejaculation and a Comparison with Ejaculated Spermatozoa in the Domestic Cat. *Theriogenology* 50(6), 973 – 979.

Axnér, E., Ström, B., Linde-Forsberg, C. (1997). Sperm Morphology is Better in the Second Ejaculate Than in the First in Domestic Cats Electroejaculated Twice During the Same Period of Anesthesia. *Theriogenology*, 47(4), 929 – 934.

Axnér, E., Ström, B., Linde-Forsberg, C., Gustavsson, I., Lindblad, K., Wallgren, M. (1996). Reproductive Disorders in 10 Domestic Male Cats. *Journal of Small Animal Practice*, 37(8), 394 – 401.

Axnér, E., Linde-Forsberg, C. (2002). Semen Collection and Assessment, and Artificial Insemination in the Cat. In: Concannon, P.W., England, G., Verstegen, J., Linde-Fosber, C. (Eds.), *Recent Advances in Small Animal Reproduction*. Ithaca: International Veterinary Information Service (www.ivis.org), Document No. A1228,0702. Acessado em 11 jan. 2009 em, <http://www.ivis.org/advances/Concannon/axner/chapter_frm.asp?LA=1>.

Axnér, E., Linde-Forsberg, C. (2007). Sperm Morphology in the Domestic Cat, and its Relation with Fertility: A Retrospective Study. *Reproduction in Domestic Animals*, 42(3), 282 – 291.

Barth, A. D., Oko, R. J. (1989). *Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa*. Ames: Iowa State University Press Inc.

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.

Colégio Brasileiro De Reprodução Animal - CBRA. (1998). *Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal* (2nd Ed.), Belo Horizonte, Brasil: Author.

Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora - CITES. *CITES Species Databases*. Acessado em 10 de jan. 2009, em <<http://www.cites.org/eng/resources/species.html>>

Comizzoli, P., Mermillod, P., Mauget, R., (2000). Reproductive Biotechnologies for Endangered Mammalian Species. *Reproduction Nutrition Development*, 40, 493 – 504.

Crawshaw Jr, P. G., Quigley, H. B. (1984). *A Ecologia do Jaguar ou Onça-pintada no Pantanal*. Relatório Final – Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Brasília, DF.

Cubas Z. S., Silva J. C. R., Catão-Dias J. L.(2006). *Tratado de Animais Selvagens*. São Paulo, Brasil:Roca.

Cullen JR, L. (1999). *Status da Conservação dos Grandes Carnívoros e Seu Potencial como “Detetives Ecológicos” para a Mata Atlântica do Pontal do Paranapanema, São Paulo*. Relatório Conclusivo – Fundação O Boticário de Proteção à Natureza (FBPN) – divulgação restrita.

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*). *Biological Reproduction*, 46, 733 – 744

Donoghue, A. M., Howard, J. G., Byers, A. P., Goodrowe, K. L., Bush, M., Blumer, E., et al.(1992). Correlation of Sperm Viability with Gamete Interaction and Fertilization In Vitro in the Cheetah (*Acinonyx Jubatus*). *Biology of Reproduction*, 46, 1047 – 1056.

Dooley, M. P., Murase, K., Pineda, M. H. (1983). An Electroejaculator for the Collection of Semen From the Domestic Cat. *Theriogenology*, 20(3), 297 – 310.

Eizirik, E.; Kim, J.H.; Raymond, M.M.; Grawshaw Jr, P.G.; O'brien, S.J.; Johnson, W.E. (2001). Phylogeography, Population History and Conservation Genetics of Jaguars (*Panthera onca*, Mammalia, Felidae). *Molecular Ecology*, 10(1), 65 – 79.

Emmons, L. H., Feer, F. (1997). *Neotropical Rainforest Mammals: A field Gide*. (2nd ed.) Chicago: The University of Chicago Press.

Hansen, K. (1992). *Cougar: the American Lion*. Northland Publishing, Flagstaff.

Howard, J. G., Donoghue, A. M., Johnston, L. A., Wildt, D. E. (1993). Zona Pellucida Filtration of Structurally Abnormal Spermatozoa and Reduced Fertilization in Teratospermic Cats. *Biology of Reproduction*, 49, 131 – 139.

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

Indrusiak, C.; Eiziric, E. (2003). Carnívoros. In: Fontana, C.S.; Bencke, G.A.; Reis, R.E. *Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada do Rio Grande do Sul*, (pp. 507 – 533). Porto Alegre: EDIPUCRS.

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA. (2003). Portaria 37/92. *Lista Oficial das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção*. Brasília, DF: Author. Acesso 12 jan. 2009, em <http://www.ibama.gov.br>.

Internacional Union for Nature Conservaion - IUCN/SSC Cat Specialist Group. (1996). *Status Survey and Conservation Action Plan Wild Cats* (Nowell, K., Jackson, P. Comp. & Ed.). Gland, Switzerland: Author.

Iriarte, J. A., Franklin, W. L., Johnson, W. E. & Redford, K. H. (1990). Biogeographic Variation of Food Habits and Body Size of the American Puma. *Oecologia*, 85(2), 185 – 190.

Johnstone, S. D. (1984). Electroejaculation in the Domestic Cat. *Australian Veterinary Journal*, 61(5), 155 – 158.

Logan, K. A., L.L. Sweanor, T.K. Ruth, And M.G. Hornocker. (1996). *Cougars of the San Andres Mountains*. Final Report, Federal Aid in Wildlife Restoration Project W-128-R, New Mexico Game and Fish, Santa Fe.

Loi, P., Ptak, G., Borboni, B., Fulka, J., Cappai, P., Clinton, M. (2001). Genetic Rescue of an Endangered Mammal by Cross-Species Nuclear Transfer Using Post-Mortem Somatic Cells. *Nature Biotechnology*. 19(10): 962 – 964.

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(1), 249 – 258.

Miotto, R.A. (2006). *Análise de DNA Fecal para a Determinação da Presença e do Número Populacional Mínimo de Onças-Pardas (Puma concolor, Felidae) em Duas Unidades de Conservação do Estado de São Paulo, o Parque Estadual do Vassununga e a Estação Ecológica de Jataí*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brasil.

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., Guimarães, M. A. B. V., Nunes, A. L. V., Carciofi, A. C., Ferreira, F., Barnabe, V. H., et al. (1998). Colheita e Avaliação do Sêmen em Onça Pintada (*Panthera onca*). *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 35(4), 178 – 181.

Munson, L., Brown, J.L., Bush, M., Packer, C., Janssen, D., Reiziss, S. M., Wildt, D.E. (1996). Genetic Diversity Affects Testicular Morphology in Free-Ranging Lions (*Panthera Leo*) of Serengeti Plains and Ngorongoro Crater. *Journal of Reproduction and Fertility*, 108, 11 – 15.

Murphy, K. M. (1998). *The Ecology of the Cougar (Puma concolor) in the Northern Yellowstone Ecosystem: Interactions with Prey, Bears, and Humans*. Ph.D. dissertation, University of Idaho, Moscow.

Nascimento, E. F., Santos, R. L. (2003). *Patologia da Reprodução dos Animais Domésticos*. (2nd Ed.). Belo Horizonte, Brasil.

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, 1517–1524.

O'Brien, M.K., D.R. McCulloch. (1985). Survival of Black-Tailed Deer Following Relocation in California. *Journal of Wildlife Management*, 49(1), 115 – 119.

O'Brien, S.J. (1977). The Family Life – the Human Cat Connection. *National Geographic*, 77 – 85.

Oettlé, E. E. (1993). Sperm Morphology and Fertility in the Dog. *Journal of Reproduction and Fertility*, 47, 257 – 260 (Suppl.).

Oliveira, T.G., Cassaro, K. (1999). *Guia de Identificação de Felinos Brasileiros*. (2nd Ed). São Paulo, Brasil: Sociedade de Zoológicos do Brasil.

Platz, C. C., Wildt, D. E., Seager, S. W. J. (1978). Pregnancy in the Domestic Cat After Artificial Insemination with Previously Frozen Spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 52, 279 – 282.

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 da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Redford, K. H. (1997). A Floresta vazia. In Valladares Padua, C.; Bodmer, R.E.; Cullen Jr., L., *Manejo e conservação de vida silvestre no Brasil* (Cap. 1:1-22). Brasília Cnpq/Belém, PA: Sociedade Mamiraua.

Redford, K.H.; Eisenberg, J.F. (1992). *Mammals of the Neotropics. Vol.2: The southern cone*. Chicago: University Chicago Press.

Ross, P.I., Jalkotzy, M.G. (1992). Characteristics of a Hunted Population of Cougars in South-Western Alberta. *The Journal of Wildlife Management*, 56(3), 417 – 426.

Sojka, N. J., Jennings, L. L. (1970). Collection and Utilization of Cat Semen for Artificial Insemination. *Journal of American Veterinary Medicine Association*, 156, 1250 – 1251.

Sojka, N. J., Jennings, L. L., Hamner, C. E. (1970). Artificial Insemination in the Cat (*Felis catus*). *Laboratory Animal Care*, 20(2), 198 – 204.

Spreadbury, B.R., Musil, K., Musil, J., Kaisner, C., & Koviak, J. (1996). Cougar Population Characteristics in Southeastern British Columbia. *Journal of Wildlife Management*, 60(4), 962 – 969.

Swanson, W.F., Howard, J.G., Roth, T.L., Brown, J.L., Alvarado, T., Burton, M., et al. (1996). Responsiveness of Ovaries to Exogenous Gonadotrophins and Laparoscopic Artificial Insemination with Frozen-Thawed Spermatozoa in Ocelots (*Felis pardalis*). *Journal of Reproduction and Fertility*, 106(1), 87 – 94.

Thundathil, J. R., Meyer, A., Palasz, T., Barth, A. D., Mapletoft, R. J. (2000). Effect of The Knobbed Acrosome Defect in Bovine Sperm on IVF and Embryo Production. *Theriogenology*, 54(6), 921 – 934.

Wildt, D.E., Roth, T.L. (1997). Assisted Reproduction for Managing and Conserving Threatened Felids. *International Zoo Yearbook*, 35(1), 164-172.

Wildt, D. E., Brown, J. L., Bush, M., Barone, M. A., Cooper, K. A., Grisham, J., Howard, J. G. (1993). Reproductive Status of Cheetahs (*Acinonyx Jubatus*) in North American Zoos: the Benefits of Physiological Surveys for Strategic Planning. *Zoo Biology*, 12(1), 45 – 80.

Wildt, D. E., Phillips, L. G., Simmons, L. G, Chakraborty, P. K., Brown, J. L., Howard, J. G., et al. (1988). A Comparative Analysis of Ejaculate and Hormonal Characteristics of the Captive Male Cheetah, Tiger, Leopard, and Puma. *Biology of Reproduction*, 38, 245 – 255.

Wildt, D. E., Bush, M., Goodrowe, K. L., Packer, C., Pusey, A. E., Brown, J. L., et al. (1987). Reproductive and Genetic Consequences of Fouding Isolated Lion Populations. *Nature*, 329(6137), 328 – 331.

Wildt, D. E., Bush M., Howard J. G., O'brien S. J., Meltzer D., Van Dyk A., et al. (1983). Unique Seminal Quality in the South African Cheetah and a Comparative Evaluation in the Domestic Cat. *Biology Reproduction*, 29, 1019 – 1025.

Zambelli, D., Belluzzi, S. (1998). Raccolta e Valutazione del Materiale Seminale di Gatto. *Praxis Veterinaria*, 1, 20 – 22.

4. CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE PUMA (*Puma concolor* LINNAEUS, 1771): USO DE DUAS CONCENTRAÇÕES DE GLICEROL NO MEIO DE CONGELAMENTO.

RESUMO

O presente trabalho objetiva a avaliação da congelabilidade do sêmen de pumas (*Puma concolor*) adultos mantidos em cativeiro, por meio da comparação de duas concentrações de glicerol no meio de congelamento. Foram utilizados cinco pumas adultos mantidos em condições de cativeiro no Centro de Reabilitação de Animais Silvestres do Mato Grosso do Sul - CRAS/MS. Para a coleta do sêmen foi utilizada a eletroejaculação. As amostras coletadas foram avaliadas quanto ao seu aspecto físico, volume, vigor, motilidade, concentração e índice espermático. Logo após foram diluídas em meio contendo glicerol, de forma a se obter concentrações finais de 5 e 7,5% , envasadas em palhetas de 0,25 mL, refrigeradas a uma taxa de $-0,55^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e congeladas a uma taxa de $-5,8^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Após descongeladas as amostras foram avaliadas quanto ao vigor, motilidade e índice espermático além de se realizar os testes de termorressistência e hiposmótico. A motilidade espermática declinou em média 32,5% e 35% nas amostras congeladas em meio com 5% e 7,5% de glicerol, respectivamente. O índice espermático declinou do sêmen a fresco em relação ao congelado, porém não houve diferença ($p < 0,05$) entre as amostras congeladas em meios com 5 e 7,5% de glicerol. Após o descongelamento índice declinou ($p < 0,05$) após 20 minutos de incubação para as amostras congeladas em ambos meios testados, porém ainda em níveis aceitáveis de uso para inseminação. O teste hiposmótico, que avalia a integridade da membrana plasmática, demonstrou que 29,25% (meio com 5% de glicerol) e 25,5% (meio com 7,5% de glicerol) dos espermatozoides possuíam as membranas intactas após o procedimento de criopreservação. O protocolo de criopreservação e descongelamento de sêmen proposto se mostrou eficiente na obtenção de amostras descongeladas com bons parâmetros, porém não houve diferença ($p < 0,05$) entre os meios testados.

Palavras chave: criopreservação, sêmen, puma, glicerol

COUGAR'S (*Puma concolor* LINNAEUS, 1771) SEMEN CRYOPRESERVATION: USE OF TWO GLYCEROL CONCENTRATIONS IN THE EXTENDER.

ABSTRACT

The aim of this study is to evaluate the frozen capacity of cougar's semen comparing two different diluents. Five adults captive cougars from Mato Grosso do Sul's Rehabilitation Center (CRAS-MS) were used in this study. Semen collection was done through electroejaculation method. The samples were evaluated using the following parameters: physics aspects, volume, concentration, sperm progressive status, sperm motility and sperm motility index. Right after that the samples were extended in extender added with glycerol to obtain glycerol's final concentration of 5 and 7,5%, packed in 0.25 ml straws, cooled at a rate $-0.55^{\circ}\text{C}/\text{min}$ for two hours (one for de cooling and one in equilibrium) and finely frozen at a rate $-5.8^{\circ}\text{C}/\text{min}$. The thawing was carried through immersion in water at 37°C during 30 seconds. The post thawed samples were evaluated using the forward progressive motility, motility, sperm longevity (thermorresistance test) and hiposmotic swelling test. The motility decrease 32.5% and 35% in the samples with 5 and 7.5% of glycerol, respectively. There was decrease ($p < 0,05$) in the sperm motility index from the fresh to thawed samples, but there were no difference ($p < 0,05$) between the samples frozen in extenders with both glycerol concentrations. This index had a decrease ($p < 0,05$) only after 20 minutes of incubation for booth extenders tested. The hiposmotic swelling test, which evaluates the plasma membrane integrity and viability, showed that 29.25% (extender with 5% of glycerol) and 25.5% (extender with 7.5% de glicerol) of the spermatozoids had their membrane intact after the cryopreservation procedure. The semen's cryopreservation and thawing procedure showed to be effective to obtain thawed samples with good parameters, but there were no difference ($p < 0,05$) between the both extenders tested.

Keywords: cryopreservation, semen, cougar, glycerol

4.1. INTRODUÇÃO

O puma (*Puma concolor*) é a segunda maior espécie de felino do Brasil, perdendo apenas para a onça-pintada (*Panthera onca*). Essa espécie possui ampla distribuição abrangendo diversos habitats, desde o Canadá até o Chile (Redford & Eisenberg, 1992; Emmons & Feer, 1997). No Brasil, pode ser encontrada em todos os biomas (Amazônia, Cerrado, Caatinga, Pantanal, Mata Atlântica e Campos Sulinos) e possui adaptação a diversos climas e ambientes, tanto em áreas primárias quanto secundárias (Oliveira & Cassaro, 1999).

O puma é classificado como vulnerável na Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção (IBAMA, 2003) e citado no apêndice II da CITES - Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CITES, 2009). As principais ameaças à população desses grandes felinos são a redução de população de suas presas, caça predatória e modificação e fragmentação de seu habitat (IUCN, 1996). A fragmentação do habitat além de restringir a disponibilidade de territórios de caça e abrigo, isola populações reduzindo a variabilidade genética, o que favorece a diminuição da fertilidade, aumenta a susceptibilidade a doenças, aumenta a propensão a anormalidades espermáticas e desbalanceamento endócrino de hormônios reprodutivos, o que afeta a espermatogênese, ovulação, morbidade e mortalidade perinatal (O'Brien & McCulloch, 1985; Wildt et al., 1987; Munson et al., 1996; Eizirik et al., 2001).

As ações ideais para o aumento da biodiversidade e redução da consangüinidade seriam estratégias de conservação *in situ*, uma vez que o objetivo destas é preservar o habitat como um todo (Wildt & Roth, 1997; Loi et al., 2001). Estas estratégias, no entanto, nem sempre são suficientes para a propagação de pequenas populações e manutenção da almejada variabilidade genética (Comizzoli, et al., 2000). Neste sentido, estratégias de conservação *ex situ* objetivam auxiliar na manutenção de uma população geneticamente viável por meio de estratégias de reprodução assistida e criopreservação de fontes genéticas (Andrabi & Maxwell, 2007).

As tecnologias de reprodução assistida como criopreservação de gametas, inseminação artificial, fertilização *in vitro* e transferência de embriões vêm sendo cada vez mais aplicadas (Donoghue et al., 1990; Miller et al., 1990; Howard et al., 1992; Wildt et al., 1992; Pope et al., 1993; Swanson et al., 1996; Roth et al., 1997; Swanson, 1998; Pope, 2000; Swanson et al.,

2002), e englobam uma diversidade de áreas inter-relacionadas, incluindo biologia de gametas, embriologia, endocrinologia e criobiologia.

Alguns danos causados pela criopreservação de gametas podem ser evitados ou pelo menos minimizados pela diluição da amostra em meio adequado para criopreservação. O crioprotetor usado rotineiramente (glicerol) promove proteção às células das conseqüências da cristalização ao aumentar a fração de água não congelada no meio extracelular. Porém sabe-se que ele apresenta efeito tóxico sobre o espermatozóide, em determinadas concentrações e temperaturas, embora esta toxicidade varie significativamente entre as diferentes espécies (Fahy, 1986; England, 1993; Nelson et al., 1999; Holt, 2000; Santos et al., 2003; Pesch & Bergmann, 2006).

Para o uso efetivo das tecnologias de criopreservação de gametas 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). A criopreservação de gametas viáveis é fundamental para a criação de um banco de reserva genômica e importante para a manutenção do potencial reprodutivo no futuro. Descrições de procedimentos de reprodução assistida em puma são escassas na literatura (Miller et al., 1990), em especial aquelas relacionadas à criopreservação de sêmen. Neste sentido, o presente experimento objetiva a avaliação da congelabilidade do sêmen de pumas adultos mantidos em cativeiro, por meio da comparação de duas concentrações de glicerol no meio de congelamento.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados cinco pumas machos adultos mantidos em condições de cativeiro no Centro de Reabilitação de Animais Silvestres do Mato Grosso do Sul (CRAS-MS). A presente experimentação foi submetida e aprovada pela comissão de ética do Departamento de Veterinária-UFV (registro nº 21/2008) e autorizada pelo IBAMA (processo nº 14561-1 de 17/04/2008).

Para obtenção do sêmen, os animais foram contidos quimicamente pelo uso de dardos anestésicos e mantidos sob anestesia. Utilizou-se como protocolo anestésico a associação de cloridrato de quetamina e cloridrato de xilazina nas doses de 10 mg/kg e 1,2 mg/kg, respectivamente. Nos casos em que o animal não entrou em plano anestésico adequado uma dose reforço de 4 mg/kg de cloridrato de quetamina e 0,4 mg/kg de cloridrato de xilazina foi

aplicada por via intramuscular. Os animais tiveram seus parâmetros vitais aferidos e avaliados, por um médico veterinário, durante e após o procedimento sendo monitorados até que conseguissem manter-se em estação, assegurando uma recuperação pós-anestésica segura.

Previamente à coleta de sêmen foi feito o esvaziamento e lavagem da bexiga, com sonda uretral estéril, seringa de 10 mL e solução fisiológica estéril, a fim de evitar a contaminação da amostra com urina. O sêmen foi coletado com auxílio de um aparelho de eletroejaculação à bateria, equipado com uma probe retal de 9 cm de perímetro, com três eletrodos longitudinais. A probe foi devidamente lubrificada e introduzida no reto do animal com as os eletrodos posicionadas ventralmente sob leve pressão. O pênis foi exposto e aproximado a um tubo graduado (Eppendorf) previamente aquecido a temperatura de 38°C, o qual foi substituído a cada série de estímulos. Foram aplicados no máximo 4 séries de 10 estímulos de 16 V com intervalos de 1 minuto entre as séries. Cada estímulo durou aproximadamente 1 segundo para ir de 0V à 16V, permanecendo por 2 a 3s, seguido por um retorno abrupto a 0V, sendo o intervalo entre os estímulos de 2 a 3s. Para uma aferição mais precisa do volume do ejaculado, utilizou-se uma micropipeta de volume ajustável.

Após as coletas, os ejaculados foram analisados quanto aos aspectos físicos (volume e cor). Imediatamente após esta análise, a amostra foi pré-diluída em meio a base de TRIS-Citrato (tabela 4.1) sem glicerol. Posteriormente, uma gota do sêmen foi colocada em uma lâmina que foi coberta com lamínula, ambos previamente aquecidos a 38° C, a fim de evitar choque térmico. Em seguida, sob aumento de 100x ao microscópio de luz monocular portátil (Handycope®), o material foi avaliado quanto à motilidade espermática progressiva e ao vigor, este numa escala de zero a cinco. Posteriormente, estes valores foram utilizados no cálculo do índice espermático ($IE = [M + (Vi \times 20)]/2$, em que M representa a motilidade e Vi o vigor espermático) que consiste na média entre vigor e motilidade espermática na qual ambos têm a mesma significância (Howard et al., 1993).

Tabela 4.1: Componentes utilizados no meio para criopreservação de sêmen de puma.

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

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 pipetada uma alíquota de 10 μ L e avaliados os parâmetros de vigor e motilidade espermática, como descrito anteriormente, aguardou-se um tempo para que os espermatozoides morressem para se proceder a contagem dos mesmos na área determinada. A concentração da solução equivale à quantidade de espermatozoides contabilizados multiplicado por 10^6 .

Após a pré-diluição em meio sem glicerol e avaliação espermática, a amostra de sêmen foi dividida em duas alíquotas de volume igual e cada uma delas foi rediluída em meio contendo 10 e 15% de glicerol, na proporção 1:1, de forma a se obter soluções finais com 5 e 7,5% de glicerol, respectivamente. As amostras foram envasadas em palhetas de 0,25 mL. Para se obter uma taxa de resfriamento de $-0,55^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (Figura 4.1) utilizou-se um recipiente térmico de 12 L com mistura de água em temperatura ambiente e gelo, ocupando uma altura de 11cm (Figura 4.3) (Bueno et al., 2001 modificado). As palhetas foram colocadas em tubo de ensaio de vidro com tampa rosqueada e este foi imerso em um frasco de vidro com tampa contendo 600 ml de água a 37°C (Figura 4.2). Este conjunto foi colocado na caixa térmica onde permaneceu por duas horas (uma hora de resfriamento e mais uma hora de equilíbrio).

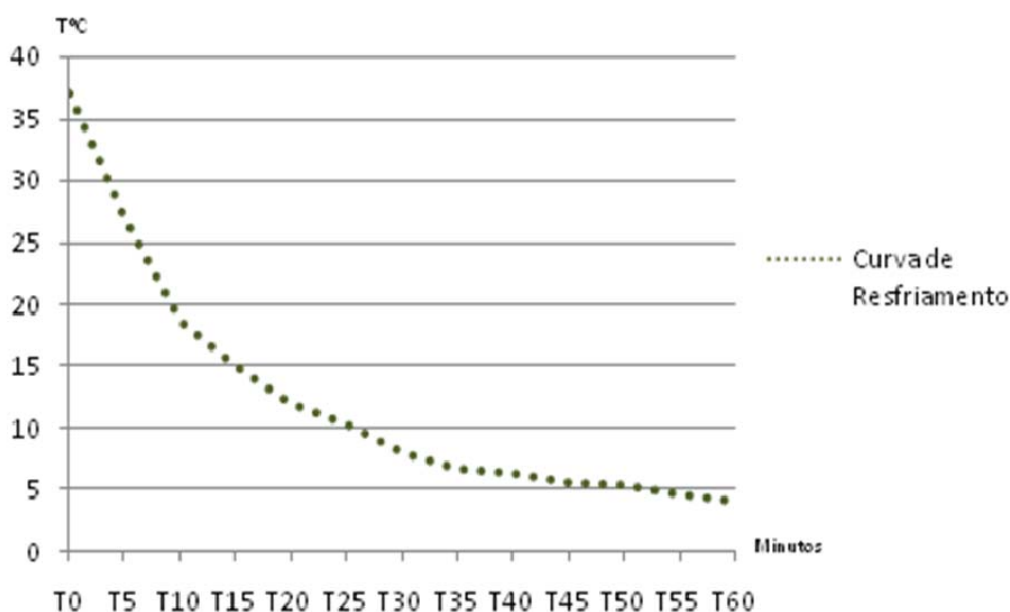


Figura 4.1: Curva de resfriamento utilizada para criopreservação de sêmen de pumas adultos mantidos em cativeiro.



Figura 4.2: Equipamentos utilizados para o resfriamento das amostras de sêmen de pumas adultos mantidos em cativeiro.

Para o congelamento utilizou-se um recipiente térmico com nitrogênio líquido a uma altura de aproximadamente três centímetros. Uma estante de isopor foi colocada sobre esta lâmina de nitrogênio líquido e as palhetas colocadas sobre a bóia de forma a ficarem a uma altura de 10 cm da lâmina de nitrogênio líquido e assim congelarem sob o vapor do nitrogênio. Desta forma obteve-se uma taxa de congelamento de $-5,8^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (Figura 4.3). Passados 15 minutos as palhetas foram imersas diretamente no nitrogênio líquido e depois armazenadas em botijão apropriado, para posterior avaliação.

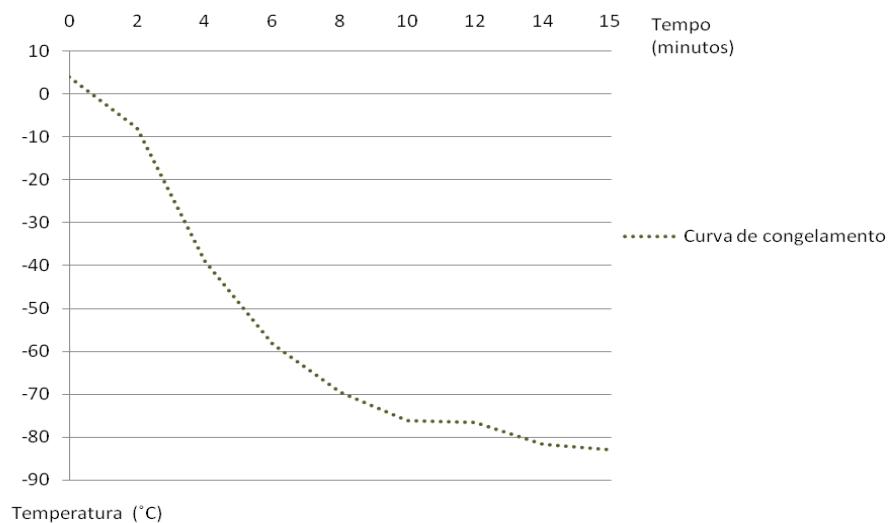


Figura 4.3: Curva de congelamento utilizada para criopreservação de sêmen de pumas adultos mantidos em cativeiro.

Após uma semana as palhetas foram descongeladas por imersão em água a 37°C por 30 segundos. Em seguida o sêmen foi transferido para frascos plásticos de 1,5mL(ependorf) e mantidos incubados em banho-maria a 37°C. Posteriormente foi analisado o vigor e a motilidade espermática como descrito para o sêmen a fresco e conduzidos os testes hiposmótico e de termorresistência. Para realização do teste hiposmótico, uma amostra de 20 µL de sêmen foi incubada a 37°C por meia hora, em 0,5 mL de solução de frutose e citrato de sódio 60 mOsmol/Kg (Kumi-Diaka, 1993). Em seguida, 200 células foram observadas em microscopia de luz com 1000x vezes de aumento para contabilização do percentual bruto de espermatozóides com cauda enrolada ou reativos ao teste hiposmótico. Dentro deste 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 cauda enrolada contabilizada antes do teste hiposmótico. Para isto, uma alíquota de 20 µL do sêmen descongelado foi adicionada a 0,5 mL de formol salina tamponada e avaliada ao microscópio de contraste de fase sob aumento de 1000x quanto à proporção especificamente de caudas enroladas.

A longevidade espermática foi estimada pelo teste de termorresistência. Para tanto o sêmen foi incubado em banho maria a 37°C por 2 horas sendo que neste período seu vigor e motilidade foram avaliados em intervalos de 20 minutos. Os dados de vigor e motilidade

espermática obtidos durante o teste de termorresistência são apresentados na forma de índice espermático.

A variável qualitativa “vigor” foi submetida ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. As variáveis quantitativas foram submetidas aos testes de Normalidade (Lilliefors) e Homocedasticidade (Cochran). Quando ocorreu diferença pela análise de variância, foi realizado o teste de comparação de médias de Ducan, adotando-se o nível de 5% de probabilidade (SAEG, 1999).

4.3. RESULTADOS

O procedimento de coleta de sêmen, por eletroejaculação, foi realizado uma vez em cada animal e em todos eles obteve-se ejaculado. Os parâmetros de vigor, motilidade e concentração se mostraram satisfatórios em quatro dos cinco animais utilizados (Tabela 4.2), sendo assim, apenas as amostras destes quatro animais foram submetidas ao procedimento de congelamento.

Tabela 4.2: Avaliação do sêmen a fresco de pumas adultos mantidos em condições de cativeiro.

Parâmetros	Puma 1	Puma 2	Puma 3	Puma 4	Puma 5
Volume total (mL)	0,4	0,5	0,4	0,5	0,4
Concentração espermática (sptz x10 ⁶ /mL)	180	400	5	60	180
Motilidade espermática (%)	60	70	10	90	80
Vigor (0-5)	3	3	1	4	4
Índice espermático (%)	60	65	15	85	80

O sêmen dos pumas apresentou motilidade espermática média de 75%, nosêmen fresco e após o descongelamento a motilidade variou de 35 a 50% nas amostras diluídas em meio com 5% de glicerol e de 30 a 50% em meio com 7,5% de glicerol (Tabela 4.3).

Tabela 4.3: Motilidade espermática de sêmen a fresco e após o descongelamento, em meios com 5 e 7,5% de glicerol, coletados de pumas adultos mantidos em condições de cativeiro.

Motilidade espermática	Puma 1	Puma 2	Puma 4	Puma 5	Média + DP (Coef. Var.)
Espermatozóides frescos	60	70	90	80	75 ± 12,91 a (17,21)
Espermatozóide pós-descongelamento, meio com 5% de glicerol	40	45	35	50	42,5 ± 6,45 b (15,18)
Espermatozóide pós-descongelamento, meio com 7,5% de glicerol	40	40	30	50	40 ± 8,16 b (20,4)

Médias com letras diferentes sobrescritas na mesma coluna são diferentes ($p < 0,05$) pelo teste de Duncan.

O vigor espermático do sêmen fresco de puma avaliados no presente trabalho apresentaram valor médio de 3,5 e nas amostras descongeladas variaram de 2 a 3 nas concentrações de 5 e 7,5% de glicerol (Tabela 4.4).

Tabela 4.4: Vigor espermático antes e após o congelamento, em meios com 5 e 7,5% de glicerol, de sêmen de pumas adultos mantidos em condições de cativeiro.

Vigor	Puma 1	Puma 2	Puma 4	Puma 5	Média ± DP (Coef. Var.)
Espermatozóides frescos	3	3	4	4	3,5 ± 0,58 a (16,50)
Espermatozóides pós-descongelamento meio com 5% de glicerol	2	3	2	3	2,5 ± 0,58 a (23,09)
Espermatozóides pós-descongelamento meio com 7,5% de glicerol	2	2	2	3	2,25 ± 0,58 a (22,22)

Não houve diferença ($p > 0,05$) entre tratamentos, pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

Os índices espermáticos de amostras frescas de sêmen de puma apresentaram média de 72,5%, enquanto as amostras descongeladas apresentaram índices espermáticos entre 37,5 e 52,5% no meio com 5% de glicerol e 35 a 55 % no meio contendo 7,5% de glicerol (Tabela 4.5).

Tabela 4.5: Índice espermático antes e após o congelamento, em meios com 5 e 7,5% de glicerol, de sêmen de pumas adultos mantidos em condições de cativeiro.

Índice espermático (%)	Puma 1	Puma 2	Puma 4	Puma 5	Média \pm DP (Coef. Var.)
Sêmen a fresco	60	65	85	80	72,5 \pm 11,90a (16,42)
Sêmen após o descongelamento, meio com 5% de glicerol	40	52,5	37,5	55	46,25 \pm 8,78b (18,98)
Sêmen após o descongelamento, meio com 7,5% de glicerol	40	40	35	55	42,5 \pm 8,66b (20,38)

Médias com letras diferentes sobrescritas na mesma coluna são diferentes ($p < 0,05$) pelo teste de Ducan.

Foram observados espermatozoides vivos até 60 minutos após o descongelamento nas amostras dos pumas 2 e 5, em ambas concentrações de glicerol, a amostra menos termorresistente foi a congelada com 7,5% de glicerol, do puma 1 (Tabela 4.6).

Tabela 4.6: Índice espermático do sêmen descongelado e incubado a 37°C, de pumas adultos mantidos em condições de cativeiro.

Tempo de incubação e meio avaliado	Puma 1	Puma 2	Puma 4	Puma 5	Média \pm DP (Coef. Var.)
T 0min Meio com 5% de glicerol	40	52,5	37,5	55	46,25 \pm 8,78 a (18,98)
T 0min Meio com 7,5% de glicerol	40	40	35	55	42,5 \pm 8,66 a (20,38)
T 20min Meio com 5% de glicerol	20	40	20	35	28,75 \pm 10,31 b (35,85)
T 20min Meio com 7,5% de glicerol	17,5	40	17,5	35	27,5 \pm 11,73 b (42,64)
T 40min Meio com 5% de glicerol	12,5	20	15	17,5	16,25 \pm 3,23 c (19,86)
T 40min Meio com 7,5% de glicerol	0	17,5	12,5	15	11,25 \pm 7,77 c, d (69,09)
T 60min Meio com 5% de glicerol	0	12,5	0	12,5	6,25 \pm 7,22 c, d (115,47)
T 60min Meio com 7,5% de glicerol	0	12,5	0	12,5	6,25 \pm 7,22 c, d (115,47)
T 80min Meio com 5% de glicerol	0	0	0	0	0 \pm 0,00 d (0)
T 80min Meio com 7,5% de glicerol	0 ^c	0 ^c	0 ^c	0 ^c	0 \pm 0,00 d (0)

Médias com letras diferentes sobrescritas na mesma coluna são diferentes ($p < 0,05$) pelo teste de Ducan.

O percentual de espermatozoides que se apresentaram com membrana funcional após o descongelamento, de acordo com o Teste Hiposmótico, variou de 8% (puma 4 com 7,5% de glicerol) a 52% na amostra do puma 5 congelada em meio com 5% de glicerol (Tabela 4.7)

Tabela 4.7: Teste hiposmótico após o descongelamento, em meios com 5 e 7,5% de glicerol, de sêmen de pumas adultos mantidos em condições de cativeiro.

Meio avaliado	Puma 1	Puma 2	Puma 4	Puma 5	Média ± DP (Coef. Var.)
Meio com 5% de glicerol (%)*	21	32	12	52	29,25 ± 17,23a (58,91)
Meio com 7,5% de glicerol (%)*	24	22	8	48	25,5 ± 16,60a (65,11)

Médias com letras diferentes sobrescritas na mesma coluna são diferentes ($p < 0,05$) pelo teste de Duncan.

*Percentual de espermatozoides com cauda enrolada após teste hiposmótico reduzido do percentual de espermatozoides com cauda enrolada patológica.

4.4. DISCUSSÃO

O glicerol é um crioprotetor extremamente eficiente, porém sabe-se que ele apresenta efeito tóxico sobre o espermatozoide. A toxicidade deste crioprotetor é influenciada pela concentração utilizada, temperatura a qual foi adicionado à amostra e da espécie estudada (Fahy, 1986; England, 1993; Nelson et al., 1999; Holt, 2000; Santos et al., 2003; Pesch & Bergmann, 2006). Stander-Breedt et al. (2004) testaram o efeito de diferentes concentrações de crioprotetores para congelamento de sêmen de outra espécie de grande felino, o leão (*Panthera leo*). Estes autores utilizaram meios acrescidos de glicerol e DMSO a 4 e 8% e observaram não haver diferenças significantes na motilidade espermática, após o descongelamento entre os quatro tratamentos. Da mesma forma, a presente experimentação não observou diferença ($p < 0,05$), quanto à motilidade espermática, entre as amostras congeladas com 5 e 7,5% de glicerol.

A motilidade espermática após o descongelamento observada no presente experimento variou de 40 a 42,5%, representando uma queda média de 33,75% em relação ao sêmen fresco. Um estudo com humanos observou correlação entre a motilidade espermática e a fertilidade. Sêmen fresco apresentando motilidade espermática $> 50\%$ no momento da fertilização apresentou taxas 75,8% de fertilização enquanto que aqueles com motilidade entre 30 a 49% apresentaram fertilidade de 49,1% e aqueles com motilidade $< 20\%$ apresentaram completa falha na fertilização (Mahadevan & Trounson, 1984). Sabidamente o processo de

criopreservação provoca danos aos espermatozóides reduzindo seus parâmetros de motilidade e vigor, e conseqüentemente a capacidade de fertilização. Baixos valores de motilidade espermática, no entanto, podem ser compensados utilizando técnicas de inseminação intra-uterina, em que o sêmen é depositado mais próximo do local da fertilização, aumentando assim a taxa de fertilidade (Villaverde & Lopes, 2007).

O índice espermático avaliado imediatamente após o descongelamento (42,5 a 46,25%) do sêmen de pumas adultos declinou ($p < 0,05$) em relação ao sêmen a fresco (72,5%), porém não houve diferença ($p < 0,05$) entre as concentrações de glicerol usadas. Parâmetros de avaliação da qualidade espermática após o descongelamento são de difícil comparação entre trabalhos distintos, dado às diferenças entre os procedimentos como o meio utilizado e as taxas de resfriamento e congelamento. Em gatos domésticos, sêmen descongelado com média de índice espermático de 65,6% apresentou 70,2% de penetração em ovócitos homólogos (Zambelli et al., 2006). Em guepardos, análises de sêmen fresco demonstraram que sêmen com índice espermático de 85 e 90% apresentaram taxa de fertilização de 62,5 a 73,3%, porém um animal com IE de 88% não fertilizou nenhum ovócito e outro com 58% de IE obteve taxa de fertilização de 42,9%. Em estudos com animais silvestres, em especial os felinos, análises de correlação da fertilidade com os diversos parâmetros de avaliação *in vitro* são pouco precisas, dado à reduzida quantidade de amostras a serem avaliadas, visto a dificuldade de acesso a estes animais e ao pequeno volume obtido no ejaculado.

A funcionalidade normal da membrana é essencial para que ocorra a fertilização sendo, portanto um importante parâmetro seminal a ser avaliado. Por meio do teste hiposmótico podemos obter uma avaliação simples da integridade da membrana plasmática. Amostras de sêmen com valores baixos para este teste (<50%) fertilizam ovócitos *in vivo* a uma taxa normal (Barrat et al., 1989; Sjoblum & Coccia, 1989), porém os embriões formados possuem baixa capacidade de implantação (Check et al., 1995; Katsoff et al., 2000). Segundo Check et al., (2001), uma possível explicação é que a alteração na membrana demonstrada pelo baixo valor no teste hiposmótico está relacionada com um fator tóxico (possivelmente uma proteína) presente na membrana plasmática do espermatozóide que pode ser transferido à membrana do embrião e impedir que este se implante no útero. Neild et al., (2000) ao estudar o teste hiposmótico na avaliação do sêmen fresco de garanhões observaram correlação entre este a porcentagem de espermatozóides móveis e a taxa de prenhes. O grupo de animais que apresentou média de 56,1% de espermatozóides reativos ao teste obteve motilidade de 41,1%

e 77% de taxa de prenhes enquanto que os que apresentaram em média 28% de espermatozóides reativos ao teste obtiveram 14,8% de espermatozóides móveis e taxa de prenhes 58,7%. Na presente experimentação, não foi observada diferença no teste hiposmótico, entre ambas as concentrações de glicerol após o descongelamento ($p < 0,05$). Semelhantemente, em cães a porcentagem de espermatozóides reativos ao teste hiposmótico não variou em sêmen congelado com 4 e 6% de glicerol (média de 18,61% para ambas) (Mascarenhas, 2008), porém os valores se apresentaram muito abaixo aos encontrados em pumas na presente experimentação (29,25% em meio com 5% de glicerol e 25,5% em meio com 7,5% de glicerol).

As amostras de sêmen de puma avaliadas na presente experimentação se apresentaram reativas ao teste hiposmótico, indicando que a osmolaridade empregada mostrou-se eficiente para a aplicação deste teste no sêmen de pumas.

O teste de termorresistência avalia a longevidade espermática e é tido como um bom preditor da fertilidade em várias espécies (England, 1993). A longevidade espermática se mostrou equivalente ($p < 0,05$) para ambas as concentrações de glicerol utilizadas na presente experimentação. Ainda de acordo com este teste, o sêmen de pumas, criopreservado com 5 e 7,5% de glicerol, permanece com índice espermático em patamares considerados viáveis para inseminação pelo menos após 20 minutos após descongelado. Em cães, os espermatozóides descongelados apresentaram-se com valores considerados viáveis para inseminação pelo menos até 30 minutos após o descongelamento (Mascarenhas, 2008).

Os valores do índice espermático no teste de termorresistência assim como o teste hiposmótico demonstraram que ambas as concentrações de glicerol utilizadas na presente experimentação apresentam potencial de uso eficaz na criopreservação de sêmen de pumas adultos mantidos em condições de cativeiro, uma vez que apresentaram resultados satisfatórios nos parâmetros testados.

A qualidade espermática após o descongelamento é afetada pelas várias etapas da criopreservação, desde o envasamento e concentração do crioprotetor utilizado até as taxas de resfriamento, congelamento e descongelamento. A influência destas etapas se dá de forma sinérgica, logo para se determinar o protocolo de criopreservação ideal para cada espécie faz-se necessário a análise conjunta destas variáveis. No entanto, o avanço no conhecimento sobre a congelabilidade de sêmen de espécies não domésticas, especialmente os grandes felinos,

esbarra na dificuldade de obtenção de amostras significativas, dado a raridade de espécimes e a complexidade no manejo destes animais. Sendo assim, dado a grande gama de técnicas a serem testadas ainda não se descreveu um protocolo definitivo, porém, de cada experimentação soma-se parâmetros e procedimentos neste sentido.

4.5. CONCLUSÕES

O protocolo proposto para coleta de sêmen de puma mantidos em cativeiro mostrou-se eficiente com a obtenção de amostras livres de contaminação com urina e em concentração satisfatória.

Ambos meios avaliados apresentaram resultados semelhantes para a criopreservação de sêmen em pumas adultos mantidos em condições de cativeiro.

Ao teste de termorresistência, o sêmen de pumas, criopreservado com 5 e 7,5% de glicerol, apresentou índice espermático em patamares considerados viáveis para inseminação pelo menos 20 minutos após descongelado.

4.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anderson, A. E. (1983). A Critical Review of Literature on Puma (*Felis concolor*) (Special Report). *Denver: Colorado Division of Wildlife, Research Section*, 54(8), 1 – 92.

Andrabi, S. M. H., Maxwell, W. M. C. (2007). A Review of Reproductive Biotechnologies for Conservation of Endangered Species. *Animal Reproduction Science*, 99(3-4), 223 – 243.

Barratt, C. L. R., Osborn, J., Harrison, P. E., Monks, N., Dunphy, B. C., Lenton, E. A., et al. (1989). The Hypo-Osmotic Swelling Test and the Sperm Mucus Penetration Test in Determining Fertilization of The Human Oocyte. *Human Reproduction*, 4(4), 430 – 434.

Bueno, R., Costa, E. P., Guimarães, J. D., Valentim, F. M. (2001). Qualidade espermática do sêmen criopreservado de cães. – Efeito do meio diluidor. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 53(3).

Byers A. P., Hunter, A. G., Seal, U. S., Binczik, G. A., Graham, E. F., Reindl, N. J., Tilson, R. L. (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.

Check, J. H., Katsoff, D., Check, M. L. (2001). Some Semen Abnormalities May Cause Infertility by Impairing Implantation Rather Than Fertilization. *Medical Hypotheses*, 56(5), 653 – 657.

Check, J. H., Stumpo, L., Lurie, D., Benfer, K., Callan, C. (1995). A Comparative Prospective Study Using Matched Samples to Determine The Influence of Subnormal

Hypoosmotic Test Cores of Spermatozoa on Subsequent Fertilization and Pregnancy Rates Following In Vitro Fertilization. *Human Reproduction*, 10, 1197 – 1200.

CITES – Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. *CITES Species Databases*. Acessado em 10 de jan. 2009., em <<http://www.cites.org/eng/resources/species.html>>

Comizzoli, P., Mermillod, P., Mauget, R., (2000). Reproductive Biotechnologies for Endangered Mammalian Species. *Reproduction Nutrition Development*, 40, 493 – 504.

Corson, W.H. (1996). *Manual Global de Ecologia* (2nd Ed.). São Paulo, Brasil: Augustus.

Crawshaw Jr, P. G., Quigley, H. B. (1984). *A Ecologia do Jaguar ou Onça-pintada no Pantanal*. Relatório Final – Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. Brasília, DF.

Cross, N. (1998). Role of Cholesterol in Sperm Capacitation. *Biology of Reproduction*, 59, 7 – 11.

Cullen JR, L. (1999). *Status da Conservação dos Grandes Carnívoros e Seu Potencial como “Detetives Ecológicos” para a Mata Atlântica do Pontal do Paranapanema, São Paulo*. Relatório Conclusivo – Fundação O Boticário de Proteção à Natureza (FBPN) – divulgação restrita.

Donoghue, A. M., Johnston, L. A., Seal, U. S., Armstrong, D. L., Simmons, L. G., Gross, T., et al. (1992). Ability of Thawed Tiger (*Panthera Tigris*) Spermatozoa to Fertilize Conspecific Eggs and Bind and Penetrate Domestic Cat Eggs *In Vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility*, 96, 555 – 564.

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*). *Biological Reproduction*, 46, 733 – 744.

Eizirik, E.; Kim, J.H.; Raymond, M.M.; Grawshaw Jr, P.G.; O'brien, S.J.; Johnson, W.E. (2001). Phylogeography, Population History and Conservation Genetics of Jaguars (*Panthera onca*, Mammalia, Felidae). *Molecular Ecology*, 10(1), 65 – 79.

Emmons, L. H., Feer, F. (1997). *Neotropical Rainforest Mammals: A field Gide* (2nd ed.). Chicago: The University of Chicago Press.

England, G. C. (1993). Criopreservação of Dog Semen: a Review. *Journal of Reproduction & Fertility*, 47, 234 – 255 (Suppl.).

Fahy, G.M. (1986). The Relevance of Cryoprotectant “Toxicity” to Cryobiology. *Cryobiology*, 23(1), 1 – 13.

Galvão, W. N. (1978). *O Impossível Retorno*. In: *Mitológica Rosiana* (pp. 13-35). São Paulo, Brasil: Editora Ática.

Hallap, T., Nagy, S., Jaakma, U., Johannisson, A., Rodriguez- Martine, H. (2006). Usefulness of a Triple Fluorochrome Combination Merocyanine 540 / Yo-Pro 1 / Hoechst 33342 in Assessing Membrane Stability of Viable Frozen-Thawed Spermatozoa from Estonian Holstein AI Bulls. *Theriogenology*, 65, 1122 – 1136.

Holt, W. V. (2000). Basic Aspects of Frozen Storage of Semen. *Animal Reproduction Science*, 62(1-3), 3 – 22.

Holt, W. V., Pickard, A. R. (1999). Role of Reproductive Technologies in Genetic Resource Banks in Animal Conservation. *Reviews of Reproduction*, 4, 143 – 150.

Howard, J.G.; Barone, M.A.; Donoghue, A.M.; Wildt, D.E. (1992). The Effect of Preovulatory Anaesthesia on Ovulation in Laparoscopically Inseminated Domestic Cats. *Journal of Reproduction & Fertility*, 96, 175 – 186.

Howard, J.G.; Bush, M., Morton, C., Morton, F., Wentzel, K. & Wildt, D. E. (1991). Comparative Semen Cryopreservation in Ferrets (*Mustela Putorius Furo*) and Pregnancies After Laparoscopic Intrauterine Insemination with Frozen–Thawed Spermatozoa. *Journal of Reproduction & Fertility*, 92, 109 – 118.

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renovaveis - IBAMA. (2003). Portaria 37/92. *Lista Oficial das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção*. Brasilia, DF: Author. Acesso 12 jan. 2009, em <http://www.ibama.gov.br>.

Internacional Union for Nature Conservaion - IUCN/SSC Cat Specialist Group. (1996). *Status Survey and Conservation Action Plan Wild Cats* (Nowell, K., Jackson, P., Comp. & Ed.). Gland, Switzerland: Author.

Januskauskas, A., Haard, M. G., Haard, M. C., Soderquist, L., Lundeheim, N., Rodriguez-Martinez, H. (1996). Estimation of Sperm Viability in Frozen-Thawed Semen from Swedish A.I. Bulls. *Zentralbl Veterinarmed A*, 43(5), 281 – 287.

Johnston, L. A., Donoghue, A. M., O'brien, S. J. & Wildt, D. E. (1991). Rescue and maturation in vitro of follicular oocytes collected from nondomestic felid species. *Biology of Reproduction*, 45(6), 898 – 906.

Katsoff, D., Check, M. L., Check, J. H. (2000). Evidence that Sperm With Low Hypoosmotic Swelling Scores Cause Embryo Implantation Defects. *Archives of Andrology*, 44(3), 227 – 230.

Logan, K. A., L.L. Sweanor, T.K. Ruth, And M.G. Hornocker. (1996). *Cougars of the San Andres Mountains*. Final Report, Federal Aid in Wildlife Restoration Project W-128-R, New Mexico Game and Fish, Santa Fe.

Lindzey, F. G., Ackerman, B. B., Barnhurst, D., Hemker, T. P., & Laing, S.P. (1994). Cougar Population Dynamics in Southern Utah. *Wildlife Society Bulletin*, 58(4), 619 – 623.

Loi, P., Ptak, G., Borboni, B., Fulka, J., Cappai, P., Clinton, M. (2001). Gentic Rescue of an Endangered Mammal by Cross-Species Nuclear Transfer Using Post-Mortem Somatic Cells. *Nature Biotechnology*. 19(10), 962 – 964.

Luvoni, G. C., Kalchschmidt, E., Leoni, S., Ruggiero, C. (2003). Conservation of Feline Semen Part I: Cooling and Freezing Protocols. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 5(4), 203–208.

Mahadevan, M. M., Trounson, A. O. (1984). The influence of seminal characteristics on the success rate of human in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, 42, 400 – 405.

Mascarenhas, R. M. (2008). *Padrão racial do sêmen canino fresco e as variações em sua congelabilidade entre diferentes raças e protocolos de congelamento*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

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(1), 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.

Munson, L., Brown, J.L., Bush, M., Packer, C., Janssen, D., Reiziss, S. M., Wildt, D.E. (1996). Genetic Diversity Affects Testicular Morphology in Free-Ranging Lions (*Panthera Leo*) of Serengeti Plains and Ngorongoro Crater. *Journal of Reproduction and Fertility* 108, 11 – 15.

Murphy, K. M. (1998). *The Ecology of the Cougar (Puma concolor) in the Northern Yellowstone Ecosystem: Interactions with Prey, Bears, and Humans*. Ph.D. dissertation, University of Idaho, Moscow.

Neild, D. M., Chaves, M. G., Flores, M., Miragaya, M. H., Gonzalez, E., Agüero, A. (2000). The HOS Test and its Relationship to Fertility in the Stallion. *Andrologia*, 32(6), 351 – 355.

Nelson, K. L., Crichton, E. G., Doty, L., Volenec, D. E., Morato, R. G., Pope, C. E., et al. (1999). Heterologous and Homologous Fertilizing Capacity of Cryopreserved Felid Sperm: a Model for Endangered Species. (Abstract). *Theriogenology*, 51, 290.

O'brien, M.K., D.R. Mculloch. (1985). Survival of Black-Tailed Deer Following Relocation in California. *Journal of Wildlife Management*, 49(1), 115 – 119.

Oliveira, T. G., Cassaro, K. (1999). *Guia de Identificação de Felinos Brasileiros*. (2nd Ed). São Paulo, Brasil: Sociedade de Zoológicos do Brasil.

Oettlé, E. E. (1993). Sperm Morphology and Fertility in the Dog. *Journal of Reproduction and Fertility*, 47, 257 – 260 (Suppl.).

Patil, S.B., Jayaprakash, D. And Shivali, S. (1998). Cryopreservation of Semen of Tigers and Lions: Computerized Analysis of the Motility Parameters of the Spermatozoa. *Current Science*, 75, 930 – 936.

Peña-Martínez, A. I. (2004). Canine Fresh and Cryopreserved Sêmen Evaluation. *Animal Reproduction Science*, 82 – 83, 209 – 224.

Pesch, S., Bergmenn, M. (2006). Structure of Mammalian Spermatozoa in Respect to Viability, Fertility and Cryopreservation. *Micron*, 37(7), 597 – 612.

Pope, C.E. (2000). Embryo Technology in Conservation Efforts for Endangered Felids. *Theriogenology*, 53(1), 163 – 174.

Pope, C. E., Keller, G. L., Dresser, B. L. (1993). In Vitro Fertilization in Domestic and Nondomestic Cats Including Sequences of Early Nuclear Events, In Vitro Development, Cryopreservation and Successful Intra and Interspecies Embryo Transfer. *Journal of Reproduction and Fertility*, 47, 189 – 201 (Suppl.).

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 da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Redford, K.H.; Eisenberg, J.F. (1992). *Mammals of the Neotropics. Vol.2: The southern cone*. Chicago: University Chicago Press.

Ross, P.I., Jalkotzy, M.G. (1992). Characteristics of a Hunted Population of Cougars in South-Western Alberta. *The Journal of Wildlife Management*, 56(3), 417 – 426.

Roth, T. L., Armstrong, D. L., Barrie, M. T., Wildt, D. E. (1997). Seasonal Effects on Ovarian Responsiveness to Exogenous Gonadotrophins and Successful Artificial Insemination in the Snow Leopard (*Uncia uncia*). *Reproduction, Fertility and Development*, 9(3), 285 – 295.

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.

Central de procesamento de dados, Viçosa. (1999). Sistema de análise estatística e genética (SAEG). Minas Gerais, Brasil: Author.

Sjoblom, P., Coccia, E. (1989). On the Diagnostic Value of the Hypoosmotic Sperm Swelling Test in an In Vitro Fertilization Program. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 6(1), 41 – 43.

Smith, K. D.; Rodriguez-Rigau, L. J.; Steinberger, E. (1977). Relation Between Indices of Semen Analysis and Pregnancy Rate in Infertile Couples. *Fertility and Sterility*, 28(12), 1314 – 1319.

Spreadbury, B.R., Musil, K., Musil, J., Kaisner, C., & Koviak, J. (1996). Cougar Population Characteristics in Southeastern British Columbia. *Journal of Wildlife Management*, 60(4), 962 – 969.

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, F. W. (1998). *Curso de Extensão – Felinos Selvagens, Biotécnicas Reprodutivas e Conservação*. Curitiba, Brasil: Setor de Ciências Biológicas, UFPR.

Swanson, W.F., Brown, J.L. (2004). International Training Programs in Reproductive Sciences for Conservation of Latin American Felids. *Animal Reproduction Science*, 82-83, 21 – 34.

Swanson, W.F., Paz, R. C. R., Morais, R. N., Gomes, M. L. F., Moraes, W., Adania, C. H. (2002). Influence of Species and Diet on Efficiency of In Vitro Fertilization in Two Endangered Brazilian Felids – the Ocelot (*Leopardus pardalis*) and Tigrina (*Leopardus tigrinus*). *Theriogenology*, 57, 593.

Swanson, W.F., Howard, J.G., Roth, T.L., Brown, J.L., Alvarado, T., Burton, M., et al. (1996). Responsiveness of Ovaries to Exogenous Gonadotrophins and Laparoscopic Artificial Insemination with Frozen-Thawed Spermatozoa in Ocelots (*Felis pardalis*). *Journal of Reproduction and Fertility*, 106(1), 87 – 94.

Thomassen, R., Sanson, G., Krogenaes, A., Fougner, J. A., Andersen Berg, K., et al. (2006). Artificial Insemination with Frozen Semen in Dogs: a Retrospective Study of 10 Years Using a Non-Surgical Approach. *Theriogenology*, 66(6-7), 1645 – 1650.

Villaverde, A. I. S. B., Lopes, M. D. (2007). Inseminação artificial em gatos domésticos utilizando sêmen criopreservado. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 31(1), 77 – 83.

Watson, P. F. (2000). The Causes of Reduced Fertility with Cryopreserved Semen. *Animal Reproduction Science*, 60-61, 481 – 492.

Watson, P. F. (1995). Recent Developments and Concepts in the Cryopreservation of Spermatozoa and the Assessment of Their Post-Thawing Function. *Reproduction, Fertility and Development*, 7(4), 871 – 891.

Wildt, D.E.; Monfort, S.L.; Donoghue, A.M.; Johnston, La.; Howard, J.G. (1992). Embryogenesis in Conservation Biology - or How to Make an Endangered Species Embryo. *Theriogenology*, 37(1), 161 – 184.

Wildt, D. E. (1990). Potencial Applications of IVF Technology for Species Conservation. In: Bavister, B. D., Cummins, J., Roldan. E. R. S. (eds), *Fertilization in Mammals* (pp. 349 – 364). Serono Symposium, Norwell.

Wildt, D.E., Roth, T.L. (1997). Assisted Reproduction for Managing and Conserving Threatened Felids. *International Zoo Yearbook*, 35(1), 164-172.

Wildt, D. E., Phillips, L. G., Simmons, L. G., Chakraborty, P. K., Brown, J. L., Howard, J. G., et al. (1988). A Comparative Analysis of Ejaculate and Hormonal Characteristics of the Captive Male Cheetah, Tiger, Leopard, and Puma. *Biology of Reproduction*, 38, 245 – 255

Wildt, D. E., Bush, M., Goodrowe, K. L., Packer, C., Pusey, A. E., Brown, J. L., et al. (1987). Reproductive and Genetic Consequences of Fouding Isolated Lion Populations. *Nature*, 329(6137), 328 – 331.

Wildt, D. E., Bush M., Howard J. G., O'brien S. J., Meltzer D., Van Dyk A., et al. (1983). Unique Seminal Quality in the South African Cheetah and a Comparative Evaluation in the Domestic Cat. *Biology Reproduction*, 29, 1019 – 1025.

Wozencraft, W.C. (1993). Order Carnivora. In Wilson, D.E. & Reeder, D.M. (eds.), *Mammal Species of the World* (2nd ed.) (279-348). Smithsonian Institution Press, Washington and London.

Zambelli, D., Merlo, B., Iacono, E., Prati, F. & Belluzzi, S. (2006). Fertilizing Ability of Electro-Ejaculated Cryopreserved Semen in the Domestic Cat. *Reproduction in Domestic Animals*, 41(2), 137 – 141.