

VINÍCIUS DE SEIXAS QUEIROZ

**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 ESPERMATOZÓIDES**



São Paulo

2003

VINÍCIUS DE SEIXAS QUEIROZ

**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 ESPERMATOZÓIDES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz
Guimarães

São Paulo

2003

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1303
FMVZ

Queiroz, Vinícius de Seixas

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 / Vinícius de Seixas Queiroz -- São Paulo : V. S. Queiroz, 2003.

130 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2003.

Programa de Pós-graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães.

1. Reprodução assistida. 2. Refrigeração seminal. 3. Capacitação espermática. 4. Reação acrossômica. 5. Jaguatirica. 6. Felidae.
I. Título.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome do autor: QUEIROZ, Vinícius de Seixas

Título: 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 espermatozóides

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Aos meus maiores incentivadores, Seu Oscar e Dona Mirian, por nunca deixarem de acreditar e por me ensinarem a lutar pelo que acredito.

À Bianca, minha eterna fonte de inspiração, por dividir comigo cada tristeza e cada alegria desta e de muitas outras aventuras de nossas vidas, pela dedicação e pelo amor.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães**, orientador e amigo, pela confiança depositada ao me dar a grata oportunidade de desbravar junto com ele o desafio da orientação.

À Associação Mata Ciliar, na figura do seu presidente **Jorge Belix de Campos** e da Médica Veterinária **Cristina Harumi Adania**, pelos ensinamentos, pela amizade, pela confiança depositada e pela oportunidade de utilizar os animais e as instalações dessa associação durante o presente estudo.

À Fundação Parque Zoológico de São Paulo, em especial ao seu Diretor Científico, **Prof. Dr. José Luiz Catão Dias**, e à Médica Veterinária **Sandra Helena Ramiro Côrrea**, pela gratificante convivência e pela oportunidade de realizar parte deste estudo utilizando os animais e as instalações dessa fundação.

À Associação Pró Carnívoros, na figura de sua presidente **Rose Lilian Gasparini Morato**, por ter cedido parte dos equipamentos sem os quais não seria possível a realização deste estudo, e em especial ao **Prof. Dr. Ronaldo Gonçalves Morato**, grande amigo e constante colaborador deste trabalho, pelo incansável incentivo desde os tempos da graduação quando despertou meu interesse pela a conservação de espécies ameaçadas.

À **Prof.a Dr.a Valquíria Hyppólito Barnabé**, por ter me orientado no início deste mestrado e por ter gentilmente cedido as instalações e os equipamentos do Laboratório de Andrologia para a realização de parte do presente estudo;

Ao **Prof. Dr. José Antônio Visintin**, por ter despertado em mim o interesse pela investigação científica nos tempos da graduação e por ter gentilmente cedido as instalações e os equipamentos dos laboratórios de embriologia e fecundação *In vitro* para o desenvolvimento de parte do presente estudo.

Ao **Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda**, pelas sugestões e comentários altamente pertinentes à metodologia experimental e por ter gentilmente cedido o Equitainer™ para a realização de parte do presente estudo.

Ao **Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira**, por ter apoiado o presente estudo cedendo gentilmente a centrífuga do Laboratório de Dosagens Hormonais assim como reagentes cruciais ao desenvolvimento dos experimentos.

Ao **Prof. Dr. Renato Campanarut Barnabé**, pelo constante apoio e incentivo e por sempre acreditar na importância do estudo da reprodução das espécies selvagens.

À **Prof.a Dr.a Maira Helena Ortiz D'Ávila Assumpção**, pelas contribuições ao delineamento do presente estudo e por ter cedido reagentes fundamentais ao desenvolvimento dos experimentos.

À **Prof. Dr. Carmen Neusa** pelos comentários e orientações precisos e proveitosos quanto ao delineamento e ao desenvolvimento deste estudo.

À **Prof.a Dr.a Silvia Renata Gaido Cortopassi**, pelo auxílio, orientação e colaboração direta na contenção química das jaguatiricas.

À **Prof.a Dr.a Maria Lúcia Zaidan Dagli** por ter gentilmente cedido o microscópio no qual foram realizadas as fotomicrografias da técnica fluorescente.

Ao companheiro de jornada **Gabriel D'Ambrósio Franca**, pela grande ajuda, pela amizade, pela dedicação incansável e principalmente pela postura crítica que certamente engrandeceram em muito este estudo.

Ao amigo **Marcílio Nichi**, pela total disponibilidade e desprendimento, por toda ajuda durante os experimentos, em especial na análise estatística e nas proveitosas discussões sobre os resultados.

À **Dr.a Roberta Mara Züge**, pela amizade, apoio incondicional e grande ajuda nas etapas iniciais do presente estudo.

À todos os colaboradores e membros da Associação Mata Ciliar, em especial à **Bióloga Cláudia** e às **Medicas Veterinárias Melissa** e **Janaína**, pelo auxílio crucial antes durante e depois das colheitas de sêmen.

Ao **Prof. Dr. Waldecir Marvullo** e ao **Prof. Dr. Paulo Mazza**, pelo grande auxílio e orientação nas análises estatísticas.

Ao **Dr. William Swanson**, grande entusiasta da conservação da jaguatirica e colaborador fundamental na análise crítica das várias etapas do presente estudo.

À **Viviane Purri de Oliveira** pelo grande auxílio e dedicação durante todo o estudo das técnicas de marcação fluorescente.

Ao amigo **Rogério Loesch Zacarioti**, pelas boas fotos, ótimas risadas e pertinentes observações críticas sobre o presente trabalho.

À **Ana Rita** pela importante ajuda na realização das fotomicrografias das técnicas de marcação fluorescente.

Ao **Renato** e à **Priscila**, pela colaboração e grande interesse nas colheitas de sêmen e preparo do material.

Aos funcionários do VRA, em especial a **Miguel, Jocimar, Érica, Dona Sílvia, Daura, Thaís** e **Irailton**, pelo constante apoio nos mais diversos aspectos do presente estudo.

A todos aqueles que se envolveram no presente estudo, auxiliando nas colheitas e no preparo de material, entre eles: **Lucas, Rodrigo, Marina, Regina, Carol, Maíra, Marie, Simone, Patrícia, Paola, Ana Paula, Maria Aparecida, Flávia, Thiago, Tatiana, Daniel, Fernanda, Cacau, Paula, Olga, Cíntia, Mileide, Diana e Tatiana.**

Aos demais amigos e colegas da pós-graduação, em especial aos participantes do **Grupo de Estudos de Reprodução de Animais Selvagens (G.E.R.A.S.)**, pelas discussões proveitosas, pelas pizzas, pelos bandeijões e por dividirem as alegrias e tristezas, anseios e realizações da pós-graduação.

À **Patrícia** e novamente ao **Marcílio** pela inestimável ajuda na impressão dos exemplares desta dissertação.

À **Bianca Campos** e ao **Oscar de Seixas Queiroz Neto** pela dedicação e paciência na revisão do texto desta dissertação.

À **Dr.a Rebecca Spindler** pelo auxílio na interpretação dos resultados do presente estudo e por ter viabilizado a apresentação de resultados preliminares do mesmo no "II International Symposium on Assisted Reproductive Technology for the Conservation and Genetic Management of Wildlife".

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, por ter viabilizado este estudo por meio da bolsa de iniciação científica, da bolsa de mestrado e do auxílio à pesquisa concedidos.

Ei, pintassilgo
Oi, pintaroxo
Melro, uirapuru
Ai, chega-e-vira
Engole-vento
Sáira, inhambu
Foge, asa-branca
Vai, patativa
Tordo, tuju, tuim
Xô, tié-sangue
Xô, tié-fogo
Xô, rouxinol, sem-fim
Some, coleiro
Anda, trigueiro
Te esconde, colibri
Voa, macuco
Voa, viúva
Utiariti
Bico calado
Toma cuidado
Que o homem vem aí
O homem vem aí
O homem vem aí

Ei, quero-quero
Oi, tico-tico
Anum, pardal, chapim
Xô, cotovia
Xô, ave-fria
Xô pescador-martim
Some, rolinha
Anda, andorinha
Te esconde, bem-te-vi
Voa, bicudo
Voa, sanhaço
Vai, juriti
Bico calado
Muito cuidado
Que o homem vem aí
O homem vem aí
O homem vem aí

Chico Buarque

RESUMO

QUEIROZ, V. S. **Estudo do efeito das condições de manipulação do sêmen de jaguatiricas (*Leopardus pardalis*, Linnaeus, 1758) sobre a capacitação e a integridade morfológica e funcional dos espermatozoides.** [Study of the effect of ocelot (*Leopardus pardalis*, Linnaeus, 1758) semen manipulation on capacitation and on morphological and functional integrity of spermatozoa]. São Paulo, 2003. 130 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)– Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

O presente estudo visou investigar o efeito da refrigeração do sêmen da jaguatirica sobre o Índice de Motilidade Espermática [$IME = (\%M + MP \times 5) / 2$; %M = proporção de espermatozoides móveis; MP = motilidade progressiva], integridade acrossomal (IA) e capacitação espermática; assim como avaliar a eficácia da técnica FITC-PNA/IP na avaliação simultânea da viabilidade espermática (VE) e IA. Sete jaguatiricas foram eletroejaculadas, sendo utilizados apenas ejaculados ($n=16$) apresentando $\%M \geq 60\%$ e $MP \geq 3$. Avaliou-se a IA por meio da Coloração Simples. Os ejaculados foram diluídos 1:1 na Variante do Diluente de Platz e submetidos aos **Protocolos de Transporte: Temperatura Ambiente e Refrigeração**, $-0,23^\circ\text{C}/\text{min}$, (Experimento 1); ou apenas **Temperatura Ambiente** (Experimentos 2 e 3). Após 2h, as alíquotas foram reaquecidas, reavaliando-se os parâmetros observados antes do transporte. Os espermatozoides foram lavados por centrifugação em meio F10 de Ham, ressuspensos nesse meio e processados conforme o experimento: **(1)** após pré-incubação (38°C ; $5\% \text{CO}_2$), durante 0, 1, 2 e 4 horas, foram retiradas alíquotas a cada intervalo para serem incubadas (30 min) na ausência e na presença do cálcio ionóforo A23187 (Ca^{2+}Ion) ($1\mu\text{M}$), avaliando-se IA e IME; **(2)** após pré-incubação por 0, 1 e 2h, foram incubadas alíquotas na ausência e presença de 1 e $2\mu\text{M}$ de Ca^{2+}Ion , avaliando-se IA e IME; **(3)** pré-incubados por 9h, sendo retiradas alíquotas a cada hora, para as avaliações da IA e VE, (a) separadamente através da Coloração Simples e do IME, ou (b) simultaneamente através da técnica FITC-PNA/IP. A

refrigeração causou declínio ($p < 0,02$) da IA (71,0%) e IME (67,1), em comparação aos valores observados antes do transporte (88,5%; 85,4), enquanto a manutenção das amostras à temperatura ambiente não afetou ($p > 0,1$) essas variáveis (84,8%; 76,4). Dentre as amostras refrigeradas, aquelas expostas ao Ca^{2+} Ion sofreram redução ($p < 0,01$) na IA (52,4%) frente ao controle (55,56%). Já nas amostras transportadas à temperatura ambiente, não foi observada diferença ($p > 0,1$) entre os grupos com e sem ionóforo (64,41% vs. 63,87%). Quando analisados os tempos separadamente, o único tratamento em que houve efeito ($p < 0,05$) do Ca^{2+} Ion sobre a IA foi aquele refrigerado e pré-incubado por 2h. Foi verificada redução ($p < 0,05$) nos valores de IME e IA devida à simples incubação, mesmo na ausência do Ca^{2+} Ion. A concentração de $2\mu\text{M}$ dessa substância foi mais efetiva na indução da reação acrossômica que $1\mu\text{M}$. Apesar dos fluorocromos FITC-PNA/IP terem se ligado aos espermatozoides, nas regiões esperadas, a proporção de células marcadas variou aleatoriamente durante pré-incubação, sem correlação ($p > 0,1$) com IME. A IA avaliada pela Coloração Simples apresentou correlação positiva ($r = 0,77$; $p < 0,0001$) com IME, decrescendo ($p < 0,0001$) durante pré-incubação. A refrigeração mostrou-se desvantajosa frente à manutenção do sêmen à temperatura ambiente, pois foi deletéria à função e às membranas dos espermatozoides. A refrigeração tornou-os capazes de responder ao estímulo do Ca^{2+} Ion, característica observada nos espermatozoides capacitados. O ensaio de reação acrossômica induzida pelo Ca^{2+} Ion deve ser aperfeiçoado para permitir avaliação acurada da capacitação espermática na jaguatirica. A Coloração Simples associada à avaliação do IME foi mais eficiente e menos laboriosa, frente à técnica FITC-PNA/IP, na avaliação da IA e VE.

Palavras chave: Reprodução assistida. Refrigeração seminal. Capacitação espermática. Reação acrossômica. Jaguatirica. Felidae.

ABSTRACT

QUEIROZ, V. S. **Study of the effect of ocelot (*Leopardus pardalis*, Linnaeus, 1758) semen manipulation on capacitation and on morphological and functional integrity of spermatozoa.** [Estudo do efeito das condições de manipulação do sêmen de jaguatiricas (*Leopardus pardalis*, Linnaeus, 1758) sobre a capacitação e a integridade morfológica e funcional dos espermatozoides]. 2003. 130 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

This study aimed to investigate the effect of ocelot semen refrigeration on Sperm Motility Index [$SMI = (\%M + PM \times 5) / 2$; %M = proportion of motile spermatozoa ; PM = Progressive Motility], acrossosomal integrity (AI) and sperm capacitation. Another objective was to evaluate the FITC-PNA/IP technique efficacy on evaluating simultaneously sperm viability (SV) and AI. Five ocelots, were electroejaculated, the semen was evaluated and only ejaculates (n=16) presenting $\%M \geq 60\%$ and $PM \geq 3$ were used. Sperm AI was evaluated using Fast Green / Rose Bengal staining (FGRB). The ejaculates were diluted 1:1 in Platz Diluent Variant and subjected to the **transportation protocols: Room Temperature** and **Cooling**, $-0.23^\circ\text{C}/\text{min}$, (experiment 1); or only **Room Temperature** (experiments 2 and 3). After 2 hours, the aliquots were rewarmed and samples were taken to re-evaluate the parameters observed before the transport. The spermatozoa were washed in Ham's F10 medium, resuspended in fresh medium and processed differently, according the experiment: **(1)** after pre-incubation (38°C ; $5\% \text{CO}_2$) during 0, 1, 2 and 4 hours, samples were taken at each time point to be incubated in the absence and presence of $1\mu\text{M}$ calcium ionophore A23187 (Ca^{2+}Ion), SMI and AI were evaluated; **(2)** after pre-incubation during 0, 1 and 2h, aliquots were incubated in the absence and presence of 1 and 2 μM Ca^{2+}Ion ; SMI and AI were evaluated; **(3)** after pre-incubation during 9h, aliquots were taken every hour to compare the evaluation of SV and AI (a) separately by the FGRB staining and SMI or (b) simultaneously by the FITC-PNA / IP

technique. Cooling caused decline ($p < 0.02$) on AI (71.0%) and SMI (67.1), when compared to values observed before transportation (88.5%; 85.4). Maintenance at room temperature didn't affect ($p > 0.1$) these variables (84.8%; 76.4). Among cooled samples, spermatozoa exposed to Ca^{2+} Ion showed smaller ($P < 0.01$) AI value (52.4%) compared to the group incubated without that substance (55.56%). For samples transported at room temperature, it wasn't observed difference ($P > 0.05$) between the groups with and without ionophore (64.41% vs. 63.87%). When time intervals were analysed separately, the only treatment in which there was effect ($p < 0,05$) of Ca^{2+} Ion on AI was the group refrigerated and pre-incubated for 2h. There was a reduction ($p < 0,05$) on SMI and AI due simply to incubation, even in the absence of Ca^{2+} Ion. The $2\mu\text{M}$ concentration of this substance was more effective to induce acrosome reaction than $1\mu\text{M}$. FITC-PNA and IP fluorocromes bound spermatozoa at the expected sites. However, proportion of marked cells varied randomly during pre-incubation, and didn't correlate ($p > 0,1$) with SMI. IA evaluated by FGRB staining showed positive correlation ($r = 0,77$; $p < 0,0001$) with SMI, decreasing ($p < 0,0001$) during incubation. Cooling was disadvantageous compared to maintaining semen at room temperature, since it was deleterious to spermatozoa membranes and function, and made those cells capable to answer the Ca^{2+} Ion challenge, a characteristic observed in capacitated spermatozoa. Ca^{2+} Ion induced acrosome reaction assay must be improved to allow accurate evaluation of sperm capacitation on ocelots. FGRB staining associated to SMI evaluation was more efficient and easier to perform, than FITC-PNA/IP technique, for AI and SV investigation.

Keywords: Assisted reproduction. Semen cooling. Sperm Capacitation. Acrosome reaction. Ocelot. Felidae.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	
2.1	COLHEITA E ANÁLISE DE SÊMEN EM FELÍDEOS.....	18
2.2	REFRIGERAÇÃO DO SÊMEN.....	21
2.3	CAPACITAÇÃO E REAÇÃO ACROSSÔMICA.....	23
2.4	CRIOCAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA.....	27
3	OBJETIVO GERAL.....	28
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
4.	MATERIAL E MÉTODO	
4.1	COLHEITA DO SÊMEN.....	29
4.2	ANÁLISE DESCRITIVA DO SÊMEN.....	33
4.3	COLORAÇÃO ACROSSOMAL SIMPLES.....	35
4.4	EXPERIMENTO 1.....	36
4.5	EXPERIMENTO 2.....	41
4.6	EXPERIMENTO 3.....	44
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	
5.1	COLHEITA E ANÁLISE DESCRITIVA DO SÊMEN.....	49
5.2	EXPERIMENTO 1.....	68
5.3	EXPERIMENTO 2.....	90
5.4	EXPERIMENTO 3.....	97
6	CONCLUSÕES.....	114
	REFERÊNCIAS.....	117
	ANEXOS.....	126

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Durante as décadas de 60 e 70, a jaguatirica (*Leopardus pardalis*) foi a espécie mais explorada pelo comércio de peles entre os gatos pintados (NOWELL; JACKSON, 1996). Atualmente este felino é incluído nas principais listas de espécies ameaçadas de extinção, como a elaborada pelo Instituto Brasileiro de Recursos Naturais Renováveis e do Meio Ambiente (IBAMA, 2000) e o Apêndice I da CITES (Convenção para o Trânsito Internacional de Espécies Ameaçadas), que inclui espécies cujo transporte só é permitido caso não implique prejuízo às mesmas e não tenha finalidades comerciais (CITES, 2000).

As intrincadas e pouco estudadas relações entre comunidades e ecossistemas, nos quais os felídeos silvestres estão inseridos, representam um forte argumento em prol da conservação dessas espécies, já que tais relações indicam os gatos como espécies-chave, cuja remoção pode alterar o balanço de comunidades vegetais e animais inteiras. Planos de conservação direcionados a uma única espécie são de especial interesse no caso de felinos como a jaguatirica pois oferecem proteção para todo um ecossistema devido aos requisitos ecológicos e territoriais desses animais (OLIVEIRA, 1994).

Atualmente, a principal causa de declínio populacional para a jaguatirica é a destruição de habitat, apesar da grande ameaça ainda representada pela caça. Tal destruição foi responsável por aumentar significativamente o risco de extinção de algumas subespécies, em especial de *Leopardus pardalis mitis*, que habita a mata atlântica brasileira. Este risco torna-se ainda mais severo, se forem consideradas as conseqüências de isolamento e perda genética associadas à fragmentação de habitat (OLIVEIRA, 1994).

Ao longo do tempo, as espécies sujeitas a esse tipo de pressão, que escaparem da extinção, deverão sofrer os efeitos da endogamia, que normalmente resultam em baixa eficiência reprodutiva (WILDT et al., 1987). A formação de populações cativas representa uma estratégia para auxiliar a manutenção da

variabilidade genética de espécies como a jaguatirca, especialmente ao se utilizar o conceito de metapopulação no manejo desse tipo de espécie (CONWAY, 1989).

Em sua análise do registro genealógico da população de jaguatirca em cativeiro no Brasil, Adania (2002) concluiu que os indivíduos dessa população não apresentam um bom desempenho reprodutivo, argumentando que a taxa de reprodução natural observada possivelmente não será capaz de garantir a manutenção de uma reserva sustentável da variabilidade genética para essa espécie, caso as condições de manejo desses animais não sejam melhoradas. Swanson e Wildt (1997) afirmam que manutenção a longo prazo de populações geneticamente viáveis de pequenos felídeos dependerá de programas de criação bem orientados, incluindo técnicas de reprodução assistida como a inseminação artificial e a fecundação *In vitro*. Embora tais técnicas jamais virão a substituir a reprodução natural, elas poderão servir como valiosas ferramentas em nossos esforços em salvar tais espécies da extinção, já que possibilitarão a troca de material genético entre populações de cativeiro e de vida livre, sem a necessidade do intercâmbio de animais (GUIMARÃES, 2001; ROTH, 1993).

Nesse contexto, o estudo da colheita, avaliação e preservação do sêmen ganha especial destaque, pois permite aumentar a eficiência dos programas de reprodução diminuindo o número de reprodutores necessários e controlando a disseminação de doenças sexualmente transmissíveis (BAILEY; BILODEAU; CORMIER, 2000; DONOGHUE et al., 1992; GUIMARÃES, 2001). Além disso, a preservação do sêmen pelo frio permite o cruzamento de indivíduos separados por longas distâncias, sem a necessidade do transporte dos animais, o que é de especial interesse para as espécies silvestres dada sua sensibilidade ao estresse (HAY et al., 1997). Atualmente, a técnica de preservação seminal mais difundida é a congelação, no entanto, para o armazenamento do sêmen por curto intervalo de tempo, a refrigeração mostra-se mais vantajosa em algumas espécies por ser menos prejudicial às células espermáticas (ENGLAND; PONZIO, 1995).

A aplicação de biotécnicas reprodutivas apresenta algumas dificuldades, como a necessidade de padronização da metodologia para a espécie em estudo. Assim, para que a técnica de fecundação *In vitro* seja aplicada com sucesso no manejo reprodutivo de determinada espécie, é necessário determinar as condições ideais

para a capacitação espermática *In vitro* de seu sêmen (YANAGIMACHI, 1994). Outra dificuldade inerente a esse tipo de estudo, utilizando animais silvestres, reside nas restrições do acesso aos espécimes de vida livre ou das coleções de cativeiro, o que obriga os pesquisadores a trabalhar com reduzido número de indivíduos e/ou repetições, dificultando assim a obtenção de informações estatisticamente significativas (WILDT, 1989). Nesse sentido, Swanson et al. (1996) concluem que a jaguatirica apresenta vantagens frente a outros felídeos, devido à excelente qualidade seminal desta espécie.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Visando introduzir aos temas específicos tratados neste trabalho, foi realizada uma breve revisão da literatura pertinente, que pode ser encontrada abaixo.

2.1 COLHEITA E ANÁLISE DE SÊMEN EM FELÍDEOS

A eletroejaculação é o método mais apropriado para a obtenção de sêmen de felídeos silvestres, devendo ser realizada em animais anestesiados (HOWARD, 1993). Esta técnica envolve a estimulação de vias nervosas dos órgãos reprodutivos por meio de eletrochoques de baixa voltagem e amperagem. Alguns anestésicos, como o halotano ou tranqüilizantes como o diazepam, podem causar o relaxamento da musculatura que envolve a vesícula urinária, resultando em contaminação do sêmen por urina (HOWARD, 1993). Essa contaminação é particularmente problemática em carnívoros; podendo também ocorrer quando a voltagem excede o mínimo necessário para a ejaculação ou quando o eletrodo é excessivamente deslocado no sentido cranial. É possível atenuar esse problema através de sondagem da bexiga, drenando-se a urina ou mesmo introduzindo meio de cultivo em seu lugar (HOWARD, 1993).

Wildt et al. (1983) padronizaram um protocolo para a eletroejaculação de guepardos (*Acinonyx jubatus*) que já foi utilizado com sucesso para a obtenção de sêmen de várias outras espécies de felídeos silvestres, tais como leopardo (*Panthera pardus*) (BROWN et al., 1989), tigre (*Panthera tigris*) (DONOGHUE et al., 1990), suçuarana (*Puma concolor*) (MILLER et al., 1990), jaguatirica (*Leopardus pardalis*) (SWANSON et al., 1996), onça-pintada (*Panthera onca*) (MORATO, 1997), entre outras.

As técnicas clássicas de avaliação seminal consistem de uma série de análises descritivas delineadas para determinar: volume de ejaculado, pH, proporção de espermatozoides móveis, motilidade progressiva, concentração espermática, morfologia estrutural, integridade acrossômica, entre outras (HOWARD, 1993). Através da proporção de espermatozoides móveis e da motilidade progressiva é possível calcular uma taxa de motilidade geral, que leva em conta esses dois aspectos, denominada Índice de Motilidade Espermática (IME) (HOWARD, 1993).

A avaliação da morfologia espermática visa basicamente determinar a proporção de células exibindo morfologia anormal (pleiomorfismo), podendo-se classificar as anomalias de várias formas. Um sistema de classificação importante divide as anormalidades espermáticas em defeitos primários e defeitos secundários, sendo os primeiros originados durante a espermatogênese e os últimos durante a maturação no epidídimo, transporte ou contato com o meio externo (HOWARD et al., 1984; WILDT, 1996).

Parece ser consenso entre a maioria dos pesquisadores, que os métodos descritivos citados acima são insatisfatórios na avaliação da capacidade fecundante de determinada amostra de sêmen (GOODROWE; HAY, 1993; HOWARD, 1993). Um aspecto fundamental nesse processo de avaliação, que é em grande parte negligenciado pelos métodos descritivos, é a determinação da integridade estrutural e funcional das membranas lipoprotéicas dos espermatozoides (WATSON, 1995).

As membranas de algumas organelas, como as do acrossomo, são especialmente sensíveis aos danos causados pelo resfriamento (BAILEY; BILODEAU; CORMIER, 2000; WATSON, 1995), assim é muito importante avaliar a integridade dessas membranas ao se estudar novos métodos de refrigeração do sêmen. No entanto, a avaliação acrossomal nos felídeos é dificultada pelo fato dessas espécies apresentarem um acrossomo estreito e de difícil visualização (DONOGHUE et al., 1992; HOWARD, 1993).

Buscando contornar essa limitação, Pope, Zhang e Dresser (1991) desenvolveram um método simples e rápido para a coloração do acrossomo, denominado *Coloração Simples*, composto basicamente de 1% de "Fast Green" e 1% de Rosa Bengala, que se mostrou efetivo para a avaliação da integridade acrossomal

do sêmen de Gatos Domésticos, Gatos-do-Deserto Indianos (*Felis silvestris ornata*), Gatos Selvagens (*F. chaus*) e Leopardos das Neves (*Panthera uncia*).

Algumas aglutininas vegetais, como a do amendoim (*Arachys hypogaea*), possuem comprovada afinidade por glicoproteínas encontradas nas membranas acrossomais dos espermatozóides de algumas espécies mamíferas (YANAGIMACHI, 1994). A sigla PNA vem do inglês: "peanut aglutinin" (aglutinina do amendoim). Ao associar-se essas lecitinas a um marcador fluorescente, como o isotiocianato de fluoresceína (FITC), é possível investigar a integridade do acrossomo. O Iodeto de Propídeo, por sua vez, é uma substância impermeável à membrana plasmática íntegra, que penetra apenas células mortas, ligando-se ao DNA dessas células, emitindo assim fluorescência vermelha, quando avaliado sob luz fluorescente; representando assim um fluorocromo interessante para avaliação da viabilidade espermática simultânea à determinação integridade acrossomal pelo FITC-PNA em uma mesma célula, já que a diferença nos comprimentos de onda torna bastante evidente a visualização dos diferentes padrões de marcação por esses fluorocromos (CUNHA, 2002).

Long et al. (1996) validaram a utilização da aglutinina do amendoim (*Arachis hypogaea*) conjugada a fluoresceína (FITC-PNA), como determinante da integridade acrossomal do espermatozóide do gato doméstico, e compararam-no com outros métodos de coloração. Os autores observaram através de microscopia eletrônica de transmissão que este corante apresenta uma ligação bastante específica à membrana externa do acrossomo, permitindo maior individualização na avaliação da integridade acrossomal em relação às outras técnicas de coloração.

2.2 REFRIGERAÇÃO DO SÊMEN

A aplicação de biotécnicas reprodutivas no manejo de populações de animais silvestres enfrenta, além de dificuldades técnicas, transtornos logísticos, como a distância entre os indivíduos que se deseja acasalar e a distância desses em relação aos centros de pesquisa. A estrutura necessária à manipulação dos gametas desses indivíduos muitas vezes só é encontrada nesses centros, havendo assim a necessidade de transportar o sêmen do local de colheita para o laboratório.

A manutenção da motilidade espermática *In vitro* depende de uma série de fatores, como a composição e temperatura do meio em que o sêmen é diluído, podendo ainda ser comprometida por constituintes do plasma seminal (HOWARD, 1993). Se mantido à temperatura ambiente, sem qualquer processamento, o sêmen de felídeos silvestres sustenta sua motilidade por no máximo duas horas (HOWARD, 1993). A diluição do sêmen em meio de cultivo convencional, como o meio F10 de Ham, pode prolongar significativamente a viabilidade espermática, ainda mais se esse sêmen for previamente centrifugado para remoção do plasma seminal (HOWARD, 1993). No entanto, a manutenção da viabilidade dos espermatozoides assim estocados muitas vezes é insatisfatória, sendo importante o desenvolvimento de técnicas de estocagem que mantenham boa qualidade espermática a médio e longo prazo (HOWARD, 1993).

Atualmente existem, de forma genérica, dois métodos para a preservação do sêmen: a refrigeração, que utiliza temperaturas acima do ponto de fusão dos líquidos, e a congelação, que utiliza temperaturas abaixo desse ponto. A aplicação prática da refrigeração tem sido mais limitada à preservação do sêmen suíno (CEROLINI et al., 2000), canino (ENGLAND; PONZIO, 1995) e eqüino (MALMGREN, 1998), não sendo descrita sua utilização rotineira em outras espécies. Isto se deve possivelmente ao fato de que o sêmen assim preservado mantém qualidade satisfatória durante intervalos de tempo limitados; porém, se utilizado dentro de médio prazo (2 dias), o sêmen refrigerado apresenta qualidade superior ao congelado nessas espécies.

Harris et al. (2001) verificaram que o sêmen do gato doméstico mantém motilidade superior a 50% e taxa de acrossomos íntegros superior a 80% após 5 dias de armazenamento a 4°C, resultados superiores aos das técnicas de congelação convencionais para a espécie. Dessa forma, o estudo da refrigeração do sêmen de felídeos silvestres pode vir a aumentar o sucesso na aplicação de técnicas como a inseminação artificial ou fecundação *In vitro* em animais cativos ou de vida livre. Além disso, o estudo de protocolos de refrigeração permite adequar as técnicas de pré-resfriamento utilizadas no processo de congelação.

Segundo Watson (1995), ao se resfriar rapidamente os espermatozóides nas temperaturas acima do ponto de fusão da solução, ocorre a perda da integridade das membranas e da função celular; fenômeno esse chamado *Choque do Resfriamento*. A severidade dos efeitos deste processo dependerá do intervalo de temperatura e da taxa de resfriamento. Ao comparar diferentes velocidades para a refrigeração de sêmen canino, Bouchard et al. (1990) verificaram que taxas de 1,0 e 0,3°C/min permitiram melhores resultados, em termos de motilidade após o reaquecimento, quando comparadas a 0,1°C/min. De forma semelhante, a taxa de 0,5°C/min mostrou-se menos nociva ao sêmen do gato doméstico que a taxa de 4°C/min, que é normalmente utilizada no pré-resfriamento para criopreservação seminal (PUKAZHENTHI et al., 1999).

A refrigeração de sêmen eqüino é realizada em recipientes especialmente elaborados que permitem o seu transporte em condições de campo, menos controladas. Dentre esses recipientes o Equitainer™ tem se mostrado o mais efetivo (MALMGREEN, 1998), permitindo taxas bastante lentas de resfriamento (~0,03°C/min) e a manutenção da temperatura entre 4 e 6°C por mais de 36 h (DOUGLAS-HAMILTON; OSOL; OSOL, 1984).

Bouchard et al. (1990) postularam que a manutenção da fertilidade pelo sêmen refrigerado de cães depende de três fatores: a) reduzido metabolismo do espermatozóide a baixas temperaturas; b) proteção contra o *Choque do Resfriamento* pelo diluidor; c) resistência ao choque inerente à espécie.

O diluidor normalmente utilizado para a congelação do sêmen de gatos domésticos foi descrito inicialmente por Platz, Wildt e Seager (1978), sendo constituído por 20% de gema de ovo, 11% de lactose e 4% de glicerol. Pukazhenth

et al. (1999) avaliaram a eficiência de uma variante desse diluidor sem glicerol (PDVF - "Platz Diluent Variant Filtered") na refrigeração do sêmen de gatos. Esses estudos levaram à conclusão de que as células espermáticas felinas possuem clara afinidade por diluentes a base de gema de ovo, uma vez que, ao serem resfriadas na presença desse diluidor, mantiveram a proporção de espermatozóides móveis e a motilidade progressiva em níveis elevados durante períodos mais longos do que o sêmen puro ou suspenso em meios de cultivo. Os autores afirmam ainda que, assim como o sêmen canino, o sêmen de gatos é mais resistente ao Choque do Resfriamento que as demais espécies de mamíferos domésticos, sugerindo ser esta uma característica dos carnívoros.

2.3 CAPACITAÇÃO E REAÇÃO ACROSSÔMICA

Os espermatozóides maturados no epidídimo são capazes de mover-se ativamente, porém só adquirem a habilidade de fecundar o oócito após permanecerem algum tempo no trato reprodutor da fêmea. As mudanças fisiológicas (funcionais) que tornam a célula espermática competente para a fertilização, são coletivamente chamadas de **capacitação**. As bases moleculares desse processo ainda não estão totalmente compreendidas; no entanto, acredita-se que o maior evento da capacitação seja a remoção ou alteração de uma capa estabilizadora da membrana plasmática, que a torna sensível ao meio de fertilização e à interação com o oócito.

A **reação acrossômica** consiste da fusão entre a membrana externa do acrossomo e a porção da membrana plasmática que o envolve, levando à liberação das enzimas acrossomais (YANAGIMACHI, 1994). Fisiologicamente, esta reação ocorre quando o espermatozóide entra em contato com a zona pelúcida, permitindo a penetração na mesma e a fusão com a membrana plasmática do oócito. Entretanto, em condições normais de capacitação, sem a participação de agentes estimuladores, pode ser observada a assim chamada *reação acrossômica espontânea*

(YANAGIMACHI, 1994), tendo-se observado que a taxa com que esse fenômeno ocorre no gato doméstico é relativamente baixa quando comparada a outras espécies (LONG et al., 1996).

A capacitação de espermatozoides *In vitro* era inicialmente conseguida através de fluidos biológicos; atualmente sabe-se que o sêmen de algumas espécies pode ser capacitado em simples soluções salinas balanceadas, enquanto o de outras necessitam determinados ingredientes especiais (YANAGIMACHI, 1994). Visando a padronização de termos, foi chamado de pré-incubação o processo de indução da capacitação e de incubação o processo de indução da reação acrossômica. No gato doméstico, a indução da capacitação espermática *In vitro* tem sido realizada em meios de cultivo celular, como o meio de Krebs com Ringer e Bicarbonato modificado (mKRB) (NIWA; OHARA; IRITANI, 1985) ou meio F10 de Ham (LONG et al., 1996; PUKAZHENTHI et al., 1999), acrescidos de fontes protéicas como o soro fetal bovino (SFB). Para o sêmen de felídeos silvestres também são utilizados meios convencionais na capacitação; como no caso do gato leopardo (*Felis bengalensis*), em que foi utilizado meio de Tyrode com e sem albumina sérica bovina (BSA), obtendo-se 58 e 8% de penetração em oócitos de gatos domésticos, respectivamente, indicando a importância dessa fonte protéica na indução da capacitação espermática dessa espécie (ANDREWS et al., 1992). Ao estudar os requerimentos para capacitação do sêmen de guepardos, valendo-se desse mesmo ensaio como indicador da capacitação, Howard, Barone e Bush (1991) verificaram taxa de penetração bem superior para os espermatozoides incubados em meio F10 de Ham contendo BSA (35%) e SFB (49%) em relação à observada para os espermatozoides cultivados em meio sem fonte protéica (7%). Se analisados em conjunto, esses dois últimos estudos sugerem que os mecanismos que controlam a capacitação são semelhantes entre as duas espécies e que as estratégias de fertilização podem estar bastante conservadas na família *Felidae* (HOWARD, 1993).

Ao estudar a fosforilação dos resíduos de tirosina de proteínas da membrana plasmática de espermatozoides de gatos domésticos, Pukazhenthhi et al. (1996) utilizaram três métodos de indução *In vitro* da capacitação desses espermatozoides: a pré-incubação em estufa por três horas na presença de 5% de soro fetal bovino, o método "swim-up" e a incubação na presença de glicoproteínas da zona pelúcida. Os

autores verificaram que a simples pré-incubação do sêmen de gatos normospérmicos na presença de 5% de soro fetal proporcionou o maior aumento da fosforilação das duas proteínas (p95 e p160) que se supõem estarem envolvidas no processo de capacitação espermática. Comparando os valores das análises densitométricas das auto-radiografias dessas proteínas marcadas com iodo radioativo, antes e depois da simples incubação com SFB, verificou-se um aumento de 3 vezes para a proteína p95 e de 2,4 vezes para a p160. Após o método de "swim-up", Pukazhenthil et al. (1996) observaram um aumento de 2,9 vezes para a p95 e de 2 vezes para a p160. Já a exposição às glicoproteínas zona pelúcida causou aumento na fosforilação apenas da proteína p95 (1,6 vezes).

Estudos com o gato doméstico (HOWARD et al., 1988) e com o tigre siberiano (*Panthera tigris*) (BYERS et al., 1989) indicaram que a retirada do fluido seminal não afetava significativamente o índice de capacitação espermática nessas espécies. Baseados nisso, os autores especulam que o fator decapacitante do plasma seminal, presente em várias espécies, pode estar ausente ou inativo nos felídeos.

Com relação à temperatura de pré-incubação, o espermatozóide do gato doméstico mostra-se capaz de sofrer capacitação à temperatura de 25°C (LONG et al., 1996). Entretanto, no estudo realizado por Byers et al. (1989) nenhum espermatozóide de tigre pré-incubado a 22°C foi capaz de penetrar oócitos de hamster sem zona pelúcida, sendo que a pré-incubação a 37°C por 2 horas permitiu taxa de penetração de 15,7%.

O tempo de pré-incubação necessário para a capacitação *In vitro*, varia consideravelmente entre as espécies (YANAGIMACHI, 1994). De acordo com Niwa, Ohara e Iritani (1985), espermatozoides recém-colhidos de epidídimos de gatos domésticos são capazes de penetrar oócitos 20 minutos após a inseminação, o que representa o menor intervalo para fecundação já registrado para qualquer amostra de sêmen fresco colhido de epidídimo. Ao comparar o sêmen ejaculado com o obtido de epidídimos de gatos Goodrowe e Hay (1993) concluem que, apesar dos espermatozoides de epidídimo acoplarem-se à zona pelúcida em maior número nos primeiros 60 min, parece não haver diferença no tempo requerido para a capacitação do sêmen obtido pelos dois modos.

Long et al. (1996) utilizaram a reação acrossômica, induzida pelo cálcio ionóforo, na avaliação da dinâmica da capacitação do sêmen de gatos domésticos ao longo de 3 horas. Os autores concluíram que o sêmen ejaculado dessa espécie requer ao menos 2 horas de pré-incubação, após a remoção do plasma seminal, para se tornar capacitado. Tal técnica de avaliação da capacitação é baseada no fato de que apenas os espermatozoides totalmente capacitados podem sofrer a reação acrossômica induzida pelo cálcio ionóforo; sendo portanto esta uma técnica de monitoramento indireto da taxa de capacitação de uma população espermática. Assim, Long et al. (1996) avaliaram a taxa de integridade acrossomal, após incubação na presença e na ausência do cálcio ionóforo (controle); considerando que diferenças significativas na proporção de acrossomos intactos obtidas por esses dois tratamentos, representaram a conclusão da capacitação por uma fração significativa da população espermática.

Segundo Yanagimachi (1994), no entanto, é possível que condições incomuns de manipulação do sêmen provoquem a reação do acrossomo sem que ocorra a capacitação. O autor afirma que o envelhecimento das células espermáticas pode levar à perda da permeabilidade seletiva de suas membranas, liberação das enzimas do acrossomo e autodigestão do mesmo, provocando a assim chamada falsa reação acrossômica. Ainda segundo esse mesmo autor, a associação do corante de DNA, Hoechst 33258, às sondas acrossomais fluorescentes representa uma técnica que permite a diferenciação entre a verdadeira e a falsa reação acrossômica. Yanagimachi (1994) afirma que células espermáticas moribundas são freqüentemente impenetráveis ao corante Hoescht, com isso algumas dessas células podem ser classificadas como vivas e potencialmente férteis.

2.4 CRIOCAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA

A membrana plasmática apresenta uma assimetria entre suas duas camadas lipídicas, que é mantida por uma enzima, cuja atividade é dependente da temperatura. A quebra dessa assimetria, devida ao resfriamento, parece estar relacionada ao desenvolvimento de uma camada lipídica externa mais fluida, característica essa encontrada no espermatozóide capacitado. Como consequência dessas alterações, ocorre um aumento da permeabilidade e da instabilidade da membrana, levando à diminuição da viabilidade espermática (WATSON, 1995).

Outro importante efeito, atribuído às alterações da membrana plasmática, é o influxo de íons cálcio durante o resfriamento; sendo sugerido que tal influxo dispararia uma cascata sinalizadora intracelular que foi associada recentemente à capacitação (BAILEY; BILODEAU; CORMIER, 2000). Esses mesmos autores listam uma série de alterações observadas nos espermatozoides capacitados, correlacionando-as a alterações muito semelhantes observadas nos espermatozoides criopreservados. Além disso, citam o teste de clortetraciclina fluorescente, através do qual observaram, para os espermatozoides criopreservados, um padrão de fluorescência igual ao observado para os espermatozoides capacitados. O mecanismo pelo qual essa **criocapacitação** ocorre não é totalmente compreendido, já que o início do processo normal de capacitação ainda não foi elucidado (BAILEY; BILODEAU; CORMIER, 2000).

Byers et al. (1989) demonstraram que espermatozoides congelados de tigre são capazes de penetrar oócitos de hamster, sem zona pelúcida, imediatamente após o reaquecimento, enquanto espermatozoides frescos requerem um período de 2 horas de pré-incubação. Espermatozoides criopreservados de onça-pintada também demonstraram não necessitar de pré-incubação quando submetidos ao mesmo ensaio (PAZ et al., 1999). Estes fatos demonstram claramente o envolvimento da congelamento na indução do processo de capacitação espermática. Assim, ao se desenvolver novos protocolos de criopreservação seminal, torna-se fundamental avaliar os efeitos das diferentes etapas desse processo sobre a dinâmica da capacitação.

3 OBJETIVO GERAL

- Avaliar os efeitos das técnicas de processamento e transporte sobre a integridade morfológica e funcional dos espermatozóides, assim como sobre a capacitação *In vitro* do sêmen da jaguatirica.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a eficácia de um protocolo adaptativo para a eletroejaculação de jaguatiricas mantidas em cativeiro;
- Investigar a eficiência das técnicas Coloração Simples e FITC-PNA / IP, na avaliação da integridade acrossomal de espermatozóides de jaguatirica;
- Investigar a eficiência da indução da reação acrossômica pelo cálcio ionóforo A23187 na avaliação da capacitação espermática nessa espécie;
- Avaliar os efeitos do transporte, à temperatura ambiente ou sob refrigeração, sobre a motilidade e integridade acrossomal das células espermáticas dessa espécie;
- Avaliar os efeitos da refrigeração sobre a resposta dessas células ao desafio com o cálcio ionóforo A23187, ao longo de 4 horas de pré-incubação.

4 MATERIAL E MÉTODO

Visando alcançar os objetivos propostos, o presente trabalho foi realizado em três etapas, que serão consideradas como três experimentos distintos, ainda que grande parte da metodologia seja comum aos três.

No primeiro experimento (Estudo do transporte e da criocapacitação espermática) foram avaliados os efeitos do transporte, à temperatura ambiente ou sob refrigeração, sobre a motilidade e integridade acrossomal dos espermatozoides; assim como os efeitos da refrigeração sobre a resposta dessas células ao desafio com o cálcio ionóforo A23187 (Ca^{2+} Ion), ao longo de 4 horas de pré-incubação.

Já no experimento 2 (Avaliação do efeito da concentração de cálcio ionóforo A23187 na indução da reação acrossômica) foram comparadas duas concentrações de Ca^{2+} Ion para a indução da reação acrossômica dos espermatozoides, ao longo de 2 horas de pré-incubação.

Por fim, no terceiro experimento (Comparação das técnicas de avaliação da integridade acrossomal e da viabilidade espermática) a eficiência da Coloração Simples na avaliação da integridade acrossomal foi comparada à da técnica mista fluorescente FITC-PNA / IP, ao longo de 9 horas de pré-incubação.

Logo abaixo é descrita a metodologia comum aos três experimentos (Colheita e Análise Descritiva do Sêmen; Coloração Acrossomal Simples). Em seguida são descritos os procedimentos específicos para cada um deles.

4.1 COLHEITA DO SÊMEN

O sêmen foi colhido de cada animal em um intervalo nunca inferior a um mês, por meio de eletroejaculação, após a contenção química dos animais. Os indivíduos permaneceram em jejum de pelo menos 12 horas antes do procedimento, sendo seu peso estimado por inspeção pouco antes da contenção. Inicialmente, os animais

foram submetidos a contenção física, com auxílio de jaula de prensa, sendo então administrada a dose de 5 a 10 mg/kg da associação tiletamina - zolazepam (Zoletil 50 - VirbacTM do Brasil) pela via intramuscular (FORSYTH, 1995).

Durante a colheita, foram controlados parâmetros vitais como temperatura, frequência cardíaca e respiratória, além de reflexos indicadores do plano anestésico. Sempre que o anestesista responsável da Associação Mata Ciliar julgou necessário para a manutenção da anestesia, foi utilizado o anestésico volátil isoflurano, procurando-se manter os animais em um plano pouco profundo para minimizar o risco de contaminação por urina. O ajuste da concentração do anestésico e do fluxo de oxigênio fornecidos ao animal foi feito por meio da observação do tônus muscular dos membros e da resposta ejaculatória aos estímulos elétricos. Constatou-se, empiricamente, que o plano em que se obtinha a melhor resposta ejaculatória, coincidia com a perda completa de movimentos voluntários, sem que houvesse total perda de tônus muscular dos membros posteriores.

O plano anestésico assim obtido correspondeu aproximadamente ao Plano I do Terceiro Estágio anestésico segundo a classificação proposta por Guedel¹ (apud FANTONI; CORTOPASSI; BERNARDI, 1999, p. 104); que se inicia com a perda dos movimentos espontâneos, ocorrendo diminuição gradativa dos reflexos e do tônus muscular enquanto a respiração torna-se automática e regular. Ao se obter esse tipo de resposta, o fornecimento de isoflurano era reduzido, evitando-se aprofundar a anestesia além desse plano, pois o aumento da concentração de anestésicos voláteis pode reduzir marcadamente a eferência do sistema nervoso simpático (SHORT, 1987) que possui papel primordial no mecanismo fisiológico que controla a ejaculação e simultaneamente evita a contaminação do sêmen por urina (BENSON, 1988; SHAFIK, 1997).

Antes do início da colheita propriamente dita, foi realizada criteriosa avaliação da genitália externa. A consistência dos testículos foi avaliada por palpação e estes subjetivamente classificados como duros, normais (firmes) ou flácidos. Foram tomadas as medidas de comprimento e largura dos testículos, com auxílio de paquímetro (**Figura 4.1.1**), por meio das quais foi estimado o volume testicular

¹ GUEDEL. Referência não fornecida por Fantoni, Cortopassi e Bernardi, 1999.

utilizando-se a fórmula $V = C \times L^2 \times 0,524$; onde V = volume testicular (cm^3), C = comprimento testicular (cm) e L = largura testicular (cm) (WILDT; BUSH; O'BRIEN, 1993). O pênis e prepúcio foram examinados quanto à integridade estrutural e presença de secreções e espículas na glândula.

O aparelho utilizado para a eletroejaculação foi o modelo Torjet™ 65C

(Eletrovét), que permite controle gradual da voltagem dos eletrochoques entre 0 e 12V. A sonda retal especialmente desenvolvida para jaguatiricas consiste de eletrodo bipolar apresentando três tiras longitudinais de cobre, sendo seu diâmetro 1,6 cm e seu comprimento 23 cm (veja desenho esquemático no **Anexo 1**). Após a lubrificação da sonda com carboxi-metil-celulose ela foi introduzida no reto do animal cerca de 15 cm (**Figura 4.1.2**), com as tiras longitudinais posicionadas



Figura 4.1.1 – Biometria testicular em jaguatirica. Jundiá, 2002



Figura 4.1.2 – Eletroejaculação em jaguatirica. Jundiá, 2002

ventralmente, exercendo-se pressão nesse sentido com o objetivo de aumentar o contato com o plexo pélvico. Antes de iniciar os estímulos elétricos, o pênis foi encaixado em tubos plásticos pré-aquecidos (**Figura 4.1.2**).

Os eletrochoques foram administrados tomando por base um protocolo modificado a partir da metodologia descrita detalhadamente por Howard (1993). Foram administrados até 90 estímulos elétricos divididos em três séries:

- Série 1: 30 estímulos (10 de 2 V, 10 de 3V e 10 de 4V);
- Série 2: 30 estímulos (10 de 3 V, 10 de 4V e 10 de 5V);
- Série 3: 20 estímulos (10 de 4V, 10 de 5V e 10 de 6V).

Cada estímulo teve uma duração de aproximadamente 2 a 3 segundos, desde o zero até a voltagem desejada, permanecendo-se 1 a 2 segundos nessa voltagem e retornando-se rapidamente ao zero para nele permanecer por 2 a 3 segundos. Entre cada série foi respeitado um intervalo de ao menos 10 minutos.

A distensão dos membros pélvicos foi acompanhada durante todos os estímulos elétricos visando assegurar o correto posicionamento da sonda retal. De acordo com a recomendação de Howard (1993), padronizou-se como sendo correto o posicionamento da sonda em que era verificada a distensão simétrica de ambos os membros, no sentido crânio – caudal.

A cada conjunto de 10 estímulos de uma mesma voltagem (sub-série), o tubo foi trocado prevenindo-se possível contaminação por urina das frações ejaculadas nas sub-séries anteriores. O sêmen que permaneceu aderido à glândula foi aspirado com auxílio de micropipeta e adicionado ao restante do ejaculado. (O termo *fração do ejaculado* será utilizado para designar a amostra de sêmen obtida durante uma sub-série, ou conjunto de 10 estímulos elétricos).

No intervalo entre as séries realizou-se a avaliação imediata do sêmen (descrita em detalhe no **Item 4.2**). A concentração espermática era subjetivamente avaliada e ao se obter uma amostra apresentando alta concentração e volume maior ou igual a 0,5 ml, o protocolo de eletroejaculação era interrompido, evitando estimulação desnecessária do animal. Com esse mesmo intuito, ao se verificar uma resposta positiva do animal em determinada sub-série, caracterizada pela obtenção uma fração do ejaculado contendo células móveis, caso ainda fosse necessária a

realização de uma nova sub-série, a voltagem administrada era a mesma da sub-série anterior. A voltagem só era aumentada novamente, caso o animal deixasse de responder positivamente aos estímulos.

4.2 ANÁLISE DESCRITIVA DO SÊMEN

Imediatamente após cada sub-série de eletrochoques, foram registrados a cor e o pH (tira reagente, MERCK) de cada *fração do ejaculado*, visando verificar contaminação por urina ou quaisquer outras alterações do sêmen perceptíveis macroscopicamente. Foram também determinados volume, proporção de espermatozóides móveis e motilidade progressiva de cada fração. O Volume Total do Ejaculado foi determinado pela soma do volume de sêmen obtido em todas as frações. O Volume Espermático foi determinado subtraindo-se do total, o volume correspondente às frações oligozoospermicas (contendo quantidade muito reduzida de espermatozóides) e azoospermicas (nas quais não foi encontrado nenhum espermatozóide).

Após a combinação das frações que apresentaram proporção de espermatozóides móveis \geq a 60% e motilidade progressiva \geq 3, que foi a porção do ejaculado efetivamente utilizada em todos os ensaios, foi retirada uma alíquota de 5 μ l, que foi fixada em 95 μ l de formol salino a 10%. Essa suspensão de células fixadas foi utilizada para determinação da concentração espermática, em câmara hematimétrica de Neubauer, e para avaliação das proporções de alterações morfológicas dos espermatozóides. Tal avaliação foi realizada em preparação úmida, entre lâmina e lamínula, em microscópio de contraste de interferência diferencial (Olympus BX50), sob aumento de 1000 vezes. A classificação dos defeitos espermáticos foi feita segundo um critério adaptado a partir dos estudos de Hafez (1987), Howard (1993), Morato (1997), Morato et al. (1998) e Paz (2000); sendo tais

defeitos divididos em primários e secundários segundo os as considerações de Barth e Oko (1989) e Morais (1999).

Vale ressaltar que em algumas das colheitas não foi obtida nenhuma fração do ejaculado apresentando proporção de espermatozoides móveis $\geq 60\%$ e motilidade progressiva ≥ 3 . Ainda que nesses casos tais ejaculados não tenham sido aproveitados para nenhum dos experimentos, foram fixadas amostras em formol salino para as avaliações de concentração e morfologia espermática, realizadas como descrito acima. Tais amostras foram obtidas a partir da mistura das frações espermáticas do ejaculado, exceto naqueles casos em que todas as frações foram aspérmicas ou oligospérmicas, sendo esses resultados apresentados **separadamente** no **Item 5.1**.

Para a determinação da proporção de espermatozoides móveis (M%) e da motilidade progressiva (MP) uma gota de sêmen foi depositada sobre lâmina para microscopia e coberta com lamínula, ambas previamente aquecidas (37°C). O material foi então examinado em microscópio de luz, binocular, sob aumento de 100 vezes, classificando-se os padrões de motilidade segundo os critérios definidos por Howard (1993). Tais critérios classificam a proporção de espermatozoides apresentando qualquer tipo de motilidade, numa escala entre 0% (nenhum espermatozoide móvel) e 100% (todos os espermatozoides móveis); a motilidade progressiva, por sua vez, avalia o padrão de motilidade dos espermatozoides, classificando-o numa escala entre 0 e 5 (sendo: 0, sem motilidade; 1, movimentos laterais leves sem progressão; 2, movimentos laterais moderados com progressão ocasional; 3, movimento progressivo freqüente porém lento; 4, movimento progressivo constante com velocidade moderada; 5, movimento progressivo rápido).

Esses dois parâmetros foram conjugados fornecendo índice de motilidade espermática, calculado por meio da fórmula: $IME = [M\% + (20 \times MP)] / 2$ (HOWARD, 1993). As avaliações desse índice foram realizadas após a colheita, após o período de transporte e também após cada intervalo de incubação do sêmen (**Item 4.4.2, 4.4.3, 4.5.2 e 4.6.2**).

4.3 COLORAÇÃO ACROSSOMAL SIMPLES

Visando acompanhar a perda da integridade acrossomal devida ao transporte (**Item 4.4.2**), ao tempo de pré-incubação (**Item 4.5.2 e 4.6.3**) e à exposição ao Ca^{2+} Ion (**Item 4.4.3 e 4.5.3**), a taxa de acrossomos íntegros foi avaliada por meio da *Coloração Simples* de Pope, Zhang e Dresser (1991), cujo corante foi preparado de acordo com o **Anexo 4**. Para a avaliação por essa coloração, uma alíquota de 3 a 5 μl de sêmen foi adicionada a outra alíquota de mesmo volume do corante *Simples*, pré-aquecida a 37°C , sendo a mistura mantida sobre mesa aquecedora por 90 a 120 segundos. O sêmen assim corado foi fixado por meio da realização de esfregaço sobre lâmina de microscopia, o qual foi analisado em microscópio de luz (Olympus BX50) no aumento de 1000 vezes. Foram contadas 200 células por lâmina, sendo elas classificadas como:

- ACROSSOMO INTACTO (AI): região acrossomal de coloração lilás, levemente mais escura que a região pós-acrossomal;
- ACROSSOMO AUSENTE (AA): região acrossomal de coloração rosa, levemente mais clara que a região pós-acrossomal.

4.4 EXPERIMENTO 1: Estudo do transporte e da criocapacitação espermática

As colheitas de sêmen deste experimento foram realizadas no período compreendido entre 2 de fevereiro e 18 de junho de 2002.

4.4.1 Animais

Neste primeiro experimento foram utilizados sete machos adultos de jaguatirica, mantidos na Associação Mata Ciliar, localizada em Jundiaí, São Paulo. Os animais permaneceram solitários ou junto a fêmeas da mesma espécie, em recintos de 21 m², com laterais e fundo de alvenaria, sendo a frente e o teto feitos de tela de segurança, com malha de dimensões adequadas à espécie. O terço posterior do piso é de concreto e o restante de terra batida com alguma vegetação. Em cada recinto, os animais tiveram acesso a área de refúgio ou cambiamento. Como itens de ambientação, cada recinto contém um estrado de madeira sobre o cambiamento, que serve como cama, galhos de árvore dispostos diagonalmente e um tanque de areia.

O regime alimentar normal dos animais consistiu de: cabeça e pescoço de frango, 3 a 5 vezes por semana; músculo bovino, 1 ou 2 vezes por semana; presas inteiras (ratos, camundongos, coelhos ou pintinhos), 1 ou 2 vezes por semana.

4.4.2 Processamento do sêmen

Após as análises seminais preliminares (pH, volume, proporção de espermatozoides móveis, motilidade progressiva, concentração e integridade

acrossomal – descritas em detalhe anteriormente nos **Item 4.2 e 4.3**), o sêmen foi suspenso, na proporção 1:1, em uma variante do diluidor desenvolvido por Platz, Wildt e Seager (1978) – PDV (“Platz Diluent Variant”) – cuja metodologia de preparo é descrita em detalhe no **Anexo 2**. Em seguida, ele foi dividido em duas alíquotas, sendo a primeira mantida à temperatura ambiente, durante 2 horas, no interior de

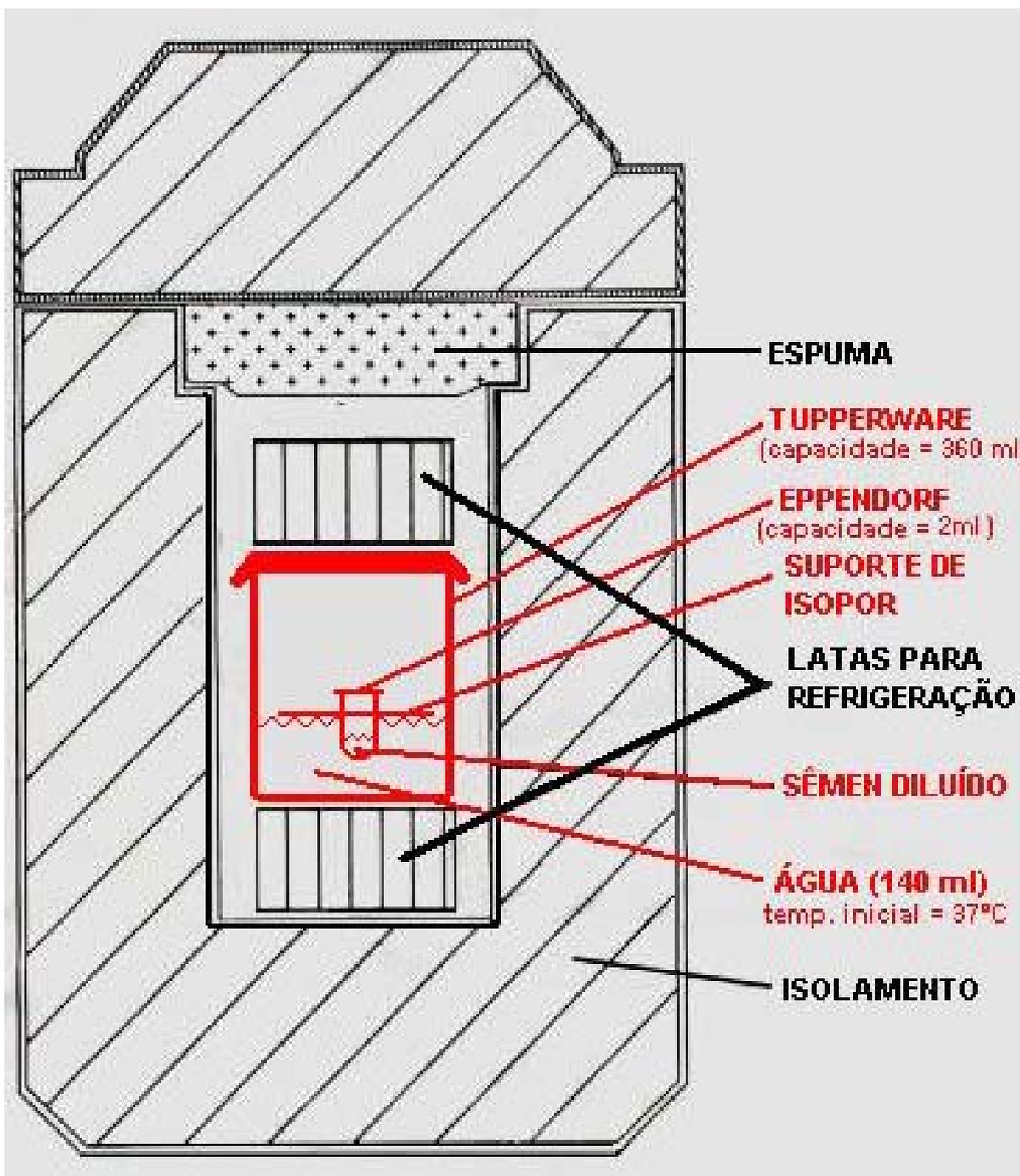


Figura 4.4.1 – Desenho esquemático do **Equitainer Modificado**. Em **preto** podem ser observados os componentes presentes no modelo original e em **vermelho**, aqueles presentes apenas nesta versão modificada

uma caixa de isopor, cujas dimensões eram: 7 cm de comprimento x 5 cm de largura x 5 cm de altura. A segunda alíquota foi refrigerada, também por 2 horas, em um dispositivo especialmente desenvolvido para a refrigeração seminal. O desenvolvimento desse dispositivo foi feito a partir do Equitainer™, que é um equipamento disponível comercialmente. As alterações realizadas no modelo original do equitainer™, podem ser observadas em vermelho na **Figura 4.4.1**, sendo as estruturas originais do equipamento observadas em preto nesse esquema. A variação da temperatura no Equitainer Modificado foi monitorada por meio de termômetro digital, cuja sonda foi inserida em tubo contendo diluidor e mantido no interior do equipamento.

Após o período de transporte o sêmen foi lentamente reaquecido em Banho Maria a 37°C. Ambas as alíquotas foram então lavadas pela adição do meio F10 de Ham com 5% de SFB (**Anexo 3**), na proporção 1:1, seguida de centrifugação (300 x G / 10 minutos) para remoção do plasma seminal e do crioprotetor.

Os *pelets* resultantes da lavagem do sêmen fresco e refrigerado foram ressuspensos em meio F10 de Ham com 5% de SFB, obtendo-se a concentração de aproximadamente 50×10^6 espermatozoides móveis/ml, sendo retiradas amostras para avaliação do índice de motilidade espermática (**Item 4.2**) e da integridade acrossomal (**Item 4.3**).

Por fim, ambas as alíquotas de sêmen ressuspendido foram mantidas separadamente em incubadora a 38°C, 5% de CO₂ e alta umidade, por 4 horas. Foram retiradas amostras para avaliação do índice de motilidade espermática (**Item 4.2**) e da capacitação (**Item 4.4.3**) nos tempos: 0h, 1h, 2h e 4h. O efeito do método de transporte sobre a taxa de capacitação espermática ao longo do tempo de pré-incubação também foi avaliado.

4.4.3 Avaliação da capacitação

No presente experimento, a capacitação espermática foi avaliada indiretamente, por meio indução da reação acrossômica pelo Ca^{2+} Ion, seguida pela avaliação da integridade acrossomal. A cada intervalo de pré-incubação para indução da capacitação (0, 1, 2 ou 4 horas), foram retiradas duas amostras de 20 μl da suspensão de células espermáticas. Uma delas foi processada como controle, enquanto a outra foi exposta ao Ca^{2+} Ion, à concentração final de 1 μM , para indução da reação acrossômica.

Para tanto, a amostra tratada foi acrescida de igual volume (20 μl) de uma solução de cálcio ionóforo A23187 (SIGMA, C7522) 2 μM , dissolvido em DMSO (Dimetil-sulfóxido) 0,05% (*Solução Ca₂* – **Anexo 6**). A amostra controle, por sua vez, foi misturada ao mesmo volume de uma solução de DMSO 0,05% (*Solução Branca* – **Anexo 6**). Como tais misturas foram realizadas na proporção 1:1, foram obtidas as concentrações finais de 1 μM para o Ca^{2+} Ion e 0,1% para o DMSO. Ambas as amostras, tratada e controle, foram então incubadas em estufa a 38°C, 5% de CO_2 e alta umidade, por 30 minutos; sendo então avaliadas quanto à integridade acrossomal e índice de motilidade espermática.

Com o objetivo de avaliar a taxa de acrossomos íntegros e reagidos após a indução da reação acrossômica, foi utilizada a *Coloração Simples* desenvolvida por Pope, Zhang e Dresser (1991) (**Item 4.3**), considerando-se a taxa de acrossomos ausentes como o índice de reação acrossômica. Diferenças significativas entre as amostras controle e as tratadas pelo Ca^{2+} Ion, quanto à proporção de espermatozoides apresentando acrossomo ausente (AA), representaram a proporção mínima de espermatozoides capacitados daquela população espermática, tendo em vista que poderiam haver espermatozoides capacitados que não houvessem completado a reação acrossômica. O fato de que a ausência do acrossomo pode ser devida à morte do espermatozoide e degeneração das membranas lipoprotéicas (falsa reação acrossômica), foi levado em consideração. Para tanto, a perda da viabilidade espermática devida ao Ca^{2+} Ion foi avaliada, comparando-se o índice de motilidade espermática das amostras controle e tratadas, logo após a incubação.

Essa comparação entre amostras tratadas e controle foi realizada para cada um dos oito grupos experimentais (4 intervalos de tempo x 2 métodos de transporte), cujas denominações adotadas e respectivos tratamentos empregados são demonstrados resumidamente na **Figura 4.4.2**.

Considerando que a temperatura ambiente, o animal, o volume e a concentração do sêmen transportado, são variáveis que não podiam ser padronizadas e que poderiam exercer influência sobre a resposta dos espermatozoides ao estímulo do Ca^{2+} Ion durante a incubação; a integridade acrossomal e o índice de motilidade espermática aferidos imediatamente após o transporte foram utilizados como covariáveis nas análises de variância, visando obter uma melhor homogeneização dos resultados.

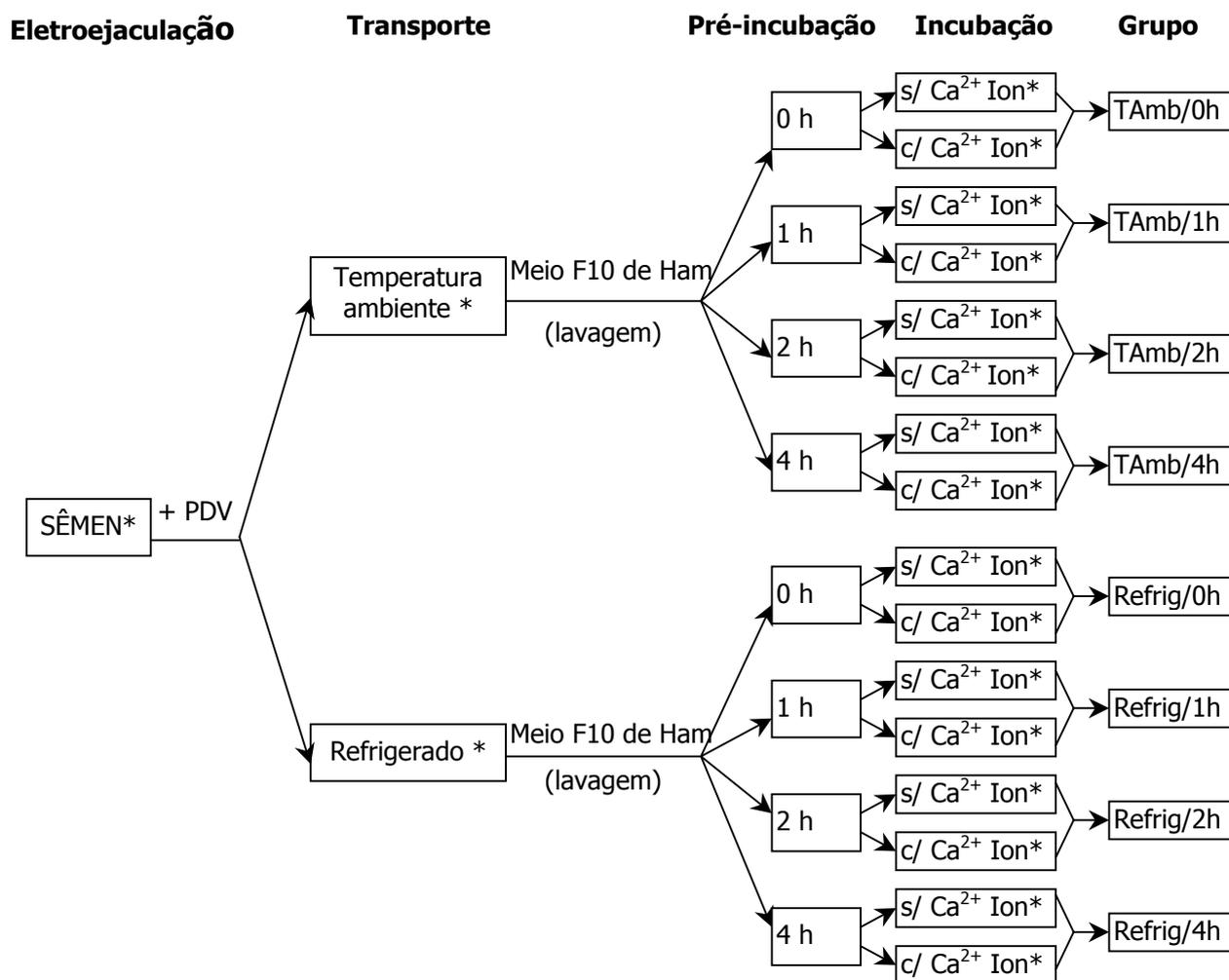


Figura 4.4.2 – Esquema representativo da metodologia de estudo do transporte e da criocapacitação espermática, apresentando as respectivas denominações adotadas para os grupos experimentais. Asteriscos indicam pontos de retirada de amostras para avaliação do índice de motilidade espermática e da integridade acrossomal

4.5 EXPERIMENTO 2: Avaliação do efeito da concentração de cálcio ionóforo A23187 na indução da reação acrossômica

As colheitas de sêmen deste experimento foram realizadas no período compreendido entre 1º de agosto de 2002 e 19 de março de 2003.

4.5.1 Animais

Nessa etapa do estudo foram utilizados três machos adultos de jaguatirica, um mantido na Associação Mata Ciliar e dois na Fundação Parque Zoológico de São Paulo. O animal alojado na Associação Mata Ciliar foi mantido sob o mesmo regime alimentar e em recinto idêntico àquele descrito anteriormente no **Item 4.4.1**. Dentre os animais da Fundação Parque Zoológico de São Paulo, o de nº 18776 foi mantido solitário, em recinto de alvenaria localizado no setor extra. Este recinto apresentava 1,90 metro de altura, 9,5 metros quadrados de área, possuía uma corda e caixa de areia como itens de ambientação, além de apresentar cambiamento cuja área já está computada no valor supracitado. Já o animal de nº 22732 foi mantido pareado em um recinto localizado no setor de exposição ao público, que apresentava área de 101,96 metros quadrados e cerca de 2,5 metros de altura. O piso desse recinto era de terra e grama e ele apresentava os mesmos itens de ambientação descritos para o recinto anterior, além de vegetação abundante, troncos e galhos.

O regime alimentar normal dos animais da Fundação Parque Zoológico de São Paulo consistiu de: coração bovino (400g), pintinhos (400g) e “premix” mineral e vitamínico (0,5g) todos os dias da semana. Esse “premix” foi fornecido procurando suprir as exigências nutricionais diárias de gatos domésticos (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1986).

4.5.2 Processamento do sêmen

O sêmen obtido foi transportado à temperatura ambiente, conforme descrito no **Item 4.4.2**, já que esse método de transporte proporcionou melhor manutenção do índice de motilidade espermática e da integridade acrossomal das amostras assim transportadas quando comparadas às amostras transportadas sob refrigeração, durante a etapa anterior deste estudo (vide **Resultados – Item 5.2**). Após o transporte, o sêmen foi lavado e pré-incubado conforme descrito no **Item 4.4.2**, sendo, no entanto, mantido na estufa por apenas 2 horas. Abaixo, segue descrição detalhada da metodologia de processamento do sêmen neste experimento.

Após as análises preliminares do sêmen fresco (pH, volume, proporção de espermatozoides móveis, motilidade progressiva, concentração e integridade acrossomal – descritas em detalhe anteriormente no **Item 4.2**), ele foi suspenso, na proporção 1:1, em uma variante do diluidor desenvolvido por Platz, Wildt e Seager (1978) – PDV (“Platz Diluent Variant”) – cuja metodologia de preparo é descrita em detalhe no **Anexo 2**. Essa suspensão foi transportada à temperatura ambiente, durante 2 horas, no interior de uma caixa de isopor, cujas dimensões eram: 7 cm de comprimento x 5 cm de largura x 5 cm de altura.

Após o período de transporte, o sêmen foi lentamente reaquecido em Banho Maria a 37°C e lavado pela adição do meio F10 de Ham com 5% de SFB (**Anexo 3**), na proporção 1:1, seguida de centrifugação (300 x G / 10 minutos) para remoção do plasma seminal e do crioprotetor.

O “pellet” resultante da lavagem foi ressuspendido em meio F10 de Ham com 5% de SFB, obtendo-se a concentração aproximada de 50×10^6 espermatozoides móveis/ml, sendo retiradas amostras para avaliação do índice de motilidade espermática (**Item 4.2**) e da integridade acrossomal (**Item 4.3**).

Por fim, o sêmen ressuspendido foi mantido em incubadora a 38°C, 5% de CO₂ e alta umidade, por 2 horas. Foram retiradas amostras para avaliação da capacitação (**Item 4.5.3**) nos tempos: 0h, 1h, 2h e 4h.

4.5.3 Avaliação da capacitação

Nesta etapa do estudo, tal como no experimento anterior, a capacitação espermática foi avaliada indiretamente, por meio indução da reação acrossômica pelo Ca^{2+} Ion , seguida pela avaliação da integridade acrossomal. Como pode-se observar abaixo, a metodologia utilizada nesse ensaio foi bastante semelhante à utilizada no ensaio da etapa anterior (**Item 4.4.3**), apresentando basicamente duas alterações: 1ª - a incubação foi acompanhada por apenas 2 horas (ao invés de 4); 2ª - a cada intervalo de incubação eram retiradas 3 amostras (ao invés de 2), a primeira delas também foi processada como controle, enquanto, para a indução da reação acrossômica da segunda e da terceira amostra, foram comparadas as concentrações finais de 1 e 2 μM do Ca^{2+} Ion. Abaixo, segue descrição detalhada da metodologia de avaliação da capacitação neste experimento.

A cada intervalo de incubação (0, 1 ou 2 horas) foram retiradas três amostras de 20 μl para a comparação das duas concentrações de Ca^{2+} Ion . A amostra tratada com a concentração final de 1 μM de Ca^{2+} Ion foi acrescida de igual volume (20 μl) de uma solução estoque dessa substância à concentração de 2 μM , dissolvido em DMSO 0,05% (*Solução Ca2 – Anexo 6*). Visando tratar outra amostra com a concentração final de 2 μM de Ca^{2+} Ion, foram acrescidos a ela 20 μl de uma solução estoque dessa substância à concentração de 4 μM , dissolvido em DMSO 0,1% (*Solução Ca4 – Anexo 6*). A amostra controle (**Grupo Controle**), como no ensaio da etapa anterior, foi misturada ao mesmo volume de uma solução de DMSO 0,05% (*Solução Branca – Anexo 6*). Todas as amostras, tratadas e controle, foram então incubadas em estufa a 38°C, 5% de CO_2 e alta umidade, por 30 minutos; sendo então avaliadas quanto à integridade acrossomal e índice de motilidade espermática.

A avaliação da reação acrossômica foi feita tal como descrito para o segundo experimento, por meio da Coloração Simples de Pope, Zhang e Dresser (1991), sendo observadas todas as considerações descritas em detalhe no **Item 4.4.3** quanto à falsa reação acrossômica e quanto à possibilidade de espermatozoides capacitados não terem completado a reação do acrossomo.

4.6 EXPERIMENTO 3: Comparação das técnicas de avaliação da integridade acrossomal e da viabilidade espermática

As colheitas de sêmen deste experimento foram realizadas no período compreendido entre 1º de agosto de 2002 e 19 de março de 2003.

4.6.1 Animais

Nessa etapa do estudo foram utilizados seis machos adultos de jaguatirica, quatro mantidos na Associação Mata Ciliar e dois na Fundação Parque Zoológico de São Paulo. A dieta e as condições dos recintos desses animais foram descritas em detalhe nos **Item 4.2.1** e **4.3.1**.

4.6.2 Processamento do sêmen

O processamento do sêmen foi bastante semelhante ao descrito no **Item 4.4.2**, apresentando basicamente duas alterações: (1) a concentração da suspensão de células antes da pré-incubação, foi ajustada entre 50 e 100 milhões de espermatozoides, visando diminuir o tempo de leitura das lâminas contendo espermatozoides marcados pelos fluorocromos; (2) a suspensão de células foi mantida em estufa por até 9 horas, ou enquanto ainda houvesse espermatozoides móveis. Abaixo, segue descrição detalhada da metodologia de processamento do sêmen neste experimento.

Após as análises preliminares do sêmen fresco (pH, volume, proporção de espermatozoides móveis, motilidade progressiva, concentração e integridade acrossomal – descritas em detalhe anteriormente nos **Item 4.2** e **4.3**), ele foi suspenso, na proporção 1:1, em uma variante do diluidor desenvolvido por Platz, Wildt e Seager (1978) – PDV (“Platz Diluent Variant”) – cuja metodologia de preparo

é descrita em detalhe no **Anexo 2**. Essa suspensão foi transportada à temperatura ambiente, durante 2 horas, no interior de uma caixa de isopor, cujas dimensões eram: sete cm de comprimento x cinco cm de largura x cinco cm de altura.

Após o período de transporte, o sêmen foi lentamente reaquecido em Banho Maria a 37°C e lavado pela adição do meio F10 de Ham com 5% de SFB (**Anexo 3**), na proporção 1:1, seguida de centrifugação (300 x G / 10 minutos) para remoção do plasma seminal e do crioprotetor.

O *pelet* resultante da lavagem foi ressuspensionado em meio F10 de Ham com 5% de SFB, obtendo-se a concentração aproximada de 50 a 100 milhões de espermatozoides móveis/ml, sendo retiradas amostras para avaliação do índice de motilidade espermática (**Item 4.2**) e da integridade acrossomal (**Item 4.3**).

Por fim, o sêmen ressuspensionado foi mantido em incubadora a 38°C, 5% de CO₂ e alta umidade, por até 9 horas, ou enquanto ainda houvesse espermatozoides móveis. A cada hora, foram retiradas amostras para avaliação da do índice de motilidade espermática, integridade acrossomal com o Corante Simples e marcação pela técnica mista FITC-PNA / IP (**Item 4.6.3**).

4.6.3 Avaliação da técnica mista FITC – PNA / IP

A metodologia desta técnica de marcação fluorescente FITC-PNA/IP foi realizada de acordo com a descrição de Cunha (2002) para cães domésticos. Foi preparada uma **solução de trabalho (Anexo 5)** para cada dia de colheita, momentos antes da avaliação das amostras.

Dessa solução foram tomados 40µl aos quais foi adicionada uma alíquota de 10 µl da amostra de sêmen. Após oito minutos, foi iniciada a avaliação dos espermatozoides assim marcados em preparação úmida, entre lâmina e lamínula, no microscópio Olympus CH 30, sob aumento de 400 vezes, sendo tal avaliação concluída em até 60 minutos. Foram contadas ao todo 200 células em campo claro,

as quais foram avaliadas individualmente em campo escuro, sob iluminação fluorescente; sendo classificadas como:

- Espermatozóides vivos c/ acrossomos intactos (**V/AI**): caso não fosse observada fluorescência no núcleo ou no capuz acrossomal, sendo o espermatozóide visível apenas sob luz comum;
- Espermatozóides vivos c/ reação acrossômica verdadeira (**RAV**): caso fosse observada fluorescência verde na região do acrossomo, a partir de seu ápice ao longo de ao menos metade de sua extensão;
- Espermatozóides mortos c/ acrossomo intacto (**M/AI**): caso fosse observada apenas fluorescência vermelha na região do núcleo do espermatozóide;
- Espermatozóides mortos c/ reação acrossômica falsa (**RAF**): caso fosse observada tanto fluorescência vermelha no terço posterior da cabeça do espermatozóide quanto verde na região do acrossomo, a partir de seu ápice ao longo de ao menos metade de sua extensão.

Posteriormente, foi investigada a presença de correlação entre os percentuais de acrossomos íntegros obtidos pelas duas técnicas; enquanto a proporção de espermatozóides vivos, determinada pelo Iodeto de Propídeo, foi correlacionada ao índice de motilidade espermática de cada amostra.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A comparação da dose administrada de anestésico injetável (corrigida para o peso corporal) e da proporção de frações do ejaculado contaminadas por urina, entre os animais que receberam suplementação anestésica por isoflurano e aqueles que não receberam, foi realizada por meio do teste T de "student", tendo sido utilizado para tanto o programa MICROSOFT EXCEL (2001).

Os dados dos três experimento foram analisados por meio do programa STATISTICAL ANALYSES SISTEM (2000). Dentre as funções desse programa, o aplicativo Guided Data Analysis foi utilizado para testar os dados quanto à normalidade dos resíduos e a homogeneidade das variâncias.

Caso fosse constatado que os dados respeitavam tais premissas, eles eram analisados por meio do PROC GLM, que executa testes paramétricos (ANOVA e testes de média). No entanto, caso os dados não obedecessem a essas premissas, eles eram transformados (Função Logarítmica na base 10 – $\log_{10}X$; Função Raiz Quadrado – RQ X; ou Função Quadrática – X^2) e se ainda assim a normalidade não fosse verificada, empregava-se o procedimento NPAR1WAYANOVA, que executa testes não paramétricos (Wilcoxon e Kruskal Wallis).

Para a descrição dos resultados, foram sempre empregados os desvios padrões e as médias (média \pm desvio padrão) dos dados originais. Os níveis de significância (p) apresentados referem-se também aos dados originais, exceto nos casos em que os dados tiveram que ser transformados para que passassem a respeitar as premissas da normalidade; neste caso os níveis de significância apresentados referem-se às análises dos dados transformados. Quando os dados não respeitaram as premissas e não havia transformação possível, foram utilizadas as médias dos dados reais e os níveis de significância das análises não paramétricas.

Para uma avaliação mais minuciosa dos resultados do primeiro experimento (Estudo do transporte e da criocapacitação espermática), os dados referentes a cada grupo experimental foram também analisados quanto ao efeito do Ca^{2+} Ion sobre a integridade acrossomal e índice de motilidade espermática, por meio do teste T para amostras pareadas, utilizando o programa "Microsoft® Excel". Foram sempre

confrontadas as amostras incubadas na presença do Ca^{2+} Ion, com as amostras correspondentes, incubadas na ausência dessa substância, que haviam recebido o mesmo tratamento até o momento da incubação. Esse mesmo teste estatístico foi utilizado para avaliar o efeito da centrifugação e da pré-incubação na ausência do Ca^{2+} Ion sobre o índice de motilidade espermática.

No terceiro experimento (Comparação das técnicas de avaliação da integridade acrossomal e da viabilidade espermática), as variáveis resposta foram também analisadas através da correlação de Pearson (PROC CORR), por meio do programa SAS System for Windows, sendo os resultados expressos através do coeficiente de correlação de Pearson (r) e seu nível de significância (p).

O nível de significância utilizado para rejeitar H_0 (hipótese de nulidade) em todos os casos foi de 5%, isto é, para um nível de significância menor que 0,05, considerou-se que ocorreram diferenças estatísticas significativas no efeito das variáveis classificatórias (tratamentos) sobre uma determinada variável resposta, ou ainda que o valor do coeficiente de correlação de Pearson foi significativo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussões referentes às colheitas e às análises preliminares do sêmen, assim como os resultados de cada um dos três experimentos são apresentados separadamente.

5.1 COLHEITA E ANÁLISE DESCRITIVA DO SÊMEN

O número de publicações encontradas na literatura atual, envolvendo o estudo das características andrológicas de jaguatiricas é limitado (HOWARD, 1993; MORAIS et al., 2002; SWANSON et al., 2003). Portanto, ainda que não esteja entre os objetivos deste trabalho, será feita uma descrição detalhada dos resultados do exame da genitália externa e da análise descritiva do sêmen, confrontando-os com os achados da literatura.

Para a realização dos ensaios de transporte e avaliação da capacitação espermática (**Experimento I**), foram realizadas 18 tentativas de eletroejaculação em 7 machos diferentes. Dentre os seis animais que haviam sido inicialmente destinados ao experimento, um deles veio a óbito antes que pudesse ser realizada qualquer tentativa de colheita de sêmen. Outro indivíduo foi retirado do grupo experimental, pois apresentou um quadro espontâneo de exposição intermitente da glândula peniana o que levou a suspeita de paresia peniana (NORTON et al., 1990). Como a eletroejaculação poderia vir a agravar esse quadro, animal foi apenas anestesiado para avaliação do referido quadro.

Três novos machos foram destinados às colheitas totalizando assim, sete animais; no entanto, dentre esses só foi possível obter sêmen de cinco indivíduos. Os machos de número **286** e **288** foram submetidos ao procedimento de eletroejaculação em duas ocasiões cada. Nas duas tentativas de eletroejaculação do macho 286 obteve-se apenas plasma seminal (azoospermia); enquanto na primeira

tentativa do **288**, foram encontradas células espermáticas imóveis e em baixíssima concentração (oligosperma), enquanto o ejaculado da segunda tentativa foi totalmente azoospérmico. A suspensão de células obtida no ejaculado oligospérmico foi centrifugada, e o *pelet* resultante fixado em formol salino para análise da morfologia espermática que indicou a presença de 78% de espermatozóides anormais. Em função desses resultados, tais indivíduos foram também retirados do grupo experimental.

Nas **Tabelas 5.1.1, 5.1.2 e 5.1.3** podem ser observados os valores correspondentes, respectivamente, aos exames andrológicos, análise descritiva do sêmen e morfologia espermática dos ejaculados que apresentaram as características mínimas exigidas (% espermatozóides móveis ≥ 60 e motilidade progressiva ≥ 3), obtidos dos cinco animais que foram mantidos no **Experimento 1**. Dentre esses animais, o de número **246** veio a óbito antes da realização dos demais experimentos, por razões não relacionadas ao presente estudo. Foram então cedidos 2 animais pela Fundação Parque Zoológico de São Paulo para que pudesse ser dada continuidade aos experimentos. Um deles pôde ser utilizado apenas no **Experimento II**, pois apresentou um quadro grave de otite infecciosa antes do início do **Experimento III**.

Portanto, nas mesmas tabelas **5.1.1 a 5.1.3** são também expostos os resultados dos mesmos parâmetros para os ejaculados dos indivíduos que foram utilizados nos experimentos **II e III**, tendo sido respeitadas as mesmas exigências quanto às características de motilidade. Ainda nessas mesmas tabelas, são apresentados os mesmos parâmetros para os ejaculados que não foram aproveitados nos experimentos (**Colheitas Descartadas**), por não terem atingido tais características mínimas de motilidade. É importante lembrar que esses ejaculados descartados foram provenientes de animais que tiveram ao menos uma colheita aproveitada em pelo menos um dos experimentos. Por fim, podem ser observados nas mesmas tabelas os totais, as médias e os respectivos desvios padrão desses parâmetros, para os ejaculados considerados como um todo.

O **peso** dos animais variou entre 9,5 e 15,0 kg, exceto por um macho (nº **22732**), que apresentou peso entre 20,3 e 21,1 Kg. Desconsiderando-se os pesos obtidos para esse animal, verifica-se que o peso dos demais machos está de acordo

aos valores observados por Oliveira e Cassaro (1999) para indivíduos de ambos os sexos provenientes de diversas regiões do Brasil (entre 8,0 e 15,1 kg; média = 11,0Kg), principalmente ao considerar-se que as fêmeas geralmente são mais leves que os machos. Apesar de ter ficado evidente que esse macho de nº **22732** era bastante obeso, ele foi mantido nos experimentos, pois o sujeito experimental de todos os ensaios não era o animal, e sim o ejaculado, que só era utilizado caso apresentasse certas características de motilidade preestabelecidas (M% \geq 60; MP \geq 3).

Tabela 5.1.1 - Resultados dos exames clínico / andrológicos realizados nas jaguatiricas, separados em função do experimento em que os ejaculados correspondentes foram utilizados (médias \pm DP) – Jundiá / São Paulo – 2002/2003

	Experimentos			Colheitas Descartadas (n = 12/5) ⁽¹⁾	Geral (n = 28/7) ⁽¹⁾
	1 (n = 7/5) ⁽¹⁾	2 (n = 3/3) ⁽¹⁾	3 (n = 6/5) ⁽¹⁾		
Peso (Kg)	12,1 \pm 1,7	16,6 \pm 6,4	11,9 \pm 0,9	12,9 \pm 3,3	12,7 \pm 2,8
Espículas Penianas (1 a 3 cruces)	2,6 \pm 0,5	3,0 \pm 0,0	2,5 \pm 0,6	2,9 \pm 0,4	2,7 \pm 0,5
Consist. Testicular (1 a 3 cruces)	2,0 \pm 0,1	2,3 \pm 0,3	2,1 \pm 0,2	2,0 \pm 0,0	2,1 \pm 0,1
Volume Testicular (cm³)	19,7 \pm 4,4	22,7 \pm 2,1	16,6 \pm 2,7	19,3 \pm 5,6	19,3 \pm 4,6
Volume Testicular Corrigido (cm³.kg⁻¹)	1,6 \pm 0,3	1,6 \pm 0,7	1,4 \pm 0,2	1,5 \pm 0,3	1,5 \pm 0,3

⁽¹⁾ n = número de colheitas / número de indivíduos;

A classificação das **espículas penianas** oscilou entre 2 e 3 cruces, sendo 3 o valor mais freqüentemente observado. Assim como descrito por Moraes (1999) para jaguatiricas, tais espículas foram abundantes em todos os machos, sendo consideradas ligeiramente menos desenvolvidas (2 cruces) em apenas seis do total de 28 avaliações. Da mesma forma, a **consistência testicular** foi bastante constante, sendo considerada normal (2), na grande maioria das observações, e

ligeiramente flácida (2,5) em 3 ocasiões para testículos esquerdos e 3 ocasiões para testículos direitos.

É sabido que no gato doméstico (FELDMAN; NELSON, 1996), assim como em algumas espécies de primatas e roedores, a presença de espículas na glândula do pênis é um indicativo da produção de testosterona pelo testículo. Tais estruturas têm sido associadas ao mecanismo de ovulação induzida em diversas espécies de felídeos, incluindo a jaguatirica, nas quais há fortes indícios de que essas espículas têm como função aumentar o estímulo mecânico junto à mucosa da vagina, durante a cópula, auxiliando assim a indução da ovulação (MORAIS, 1999). Quanto à consistência do testículo, alterações na mesma podem ser um indicativo de algumas afecções dessa gônada, como a hipoplasia ou a fibrose, as quais podem estar associadas a diversos quadros mórbidos que podem comprometer a esteroidogênese e a espermatogênese (WILDT, 1996).

Com base nessas considerações, fica evidente a importância de se avaliar a presença de espículas penianas e a consistência dos testículos durante o exame andrológico. No entanto, no presente estudo essas características foram muito constantes e mesmo as leves alterações observadas em um reduzido número de exames não estiveram associadas a uma resposta menos efetiva à eletroejaculação. Vale notar que em todas as oito colheitas aspérmicas / oligospérmicas, tanto dos dois animais que foram retirados dos experimentos como dos quatro que foram mantidos, as espículas se apresentaram abundantes (3 cruzes) enquanto a consistência testicular foi normal (2). Dessa forma, alterações acentuadas nessas características podem ser indicativas de afecções do trato reprodutivo, no entanto, o fato dessas características se apresentarem normais não exclui a possibilidade da existência desse tipo de afecção.

A média observada para o valor absoluto do **volume testicular** neste estudo – $19,3 \text{ cm}^3$ – foi bastante inferior à registrada por Morais et al. (2002) – $32,0 \text{ cm}^3$ – sendo mais próxima à observada por Swanson et al. (2003) – $22,0 \text{ cm}^3$. A média do **volume testicular corrigido** para o peso corporal no presente estudo – $1,5 \text{ cm}^3 \cdot \text{kg}^{-1}$ – foi também inferior à observada por Morais et al. (2002) – $2,3 \text{ cm}^3 \cdot \text{kg}^{-1}$; enquanto Swanson et al. (2003) não forneceu esse valor. As diferenças observadas no volume testicular podem ser relacionadas ao erro inerente ao observador na

tomada de medida dos testículos. A falta de padronização de metodologias entre laboratórios foi uma causa de variação apontada por Morais (1999) e por Wildt (1996). Mais especificamente, a fonte de variação neste caso pode ter sido o eixo utilizado para a tomada da medida da largura dos testículos, já que existem diferenças entre os eixos dorso-ventral e latero-lateral, lembrando que os testículos dos felinos se apresentam com o maior eixo direcionado no sentido crânio-caudal (DYCE; SACK; WENSING, 1990). No presente estudo padronizou-se a tomada da medida da largura no sentido latero-lateral, enquanto não foi encontrada menção a esse detalhe metodológico nos demais estudos com os quais os resultados de volume testicular foram comparados (MORAIS et al., 2002; SWNASON et al., 2003).

Quanto à **contenção química**, a equipe de veterinários responsável pela realização desse procedimento para os animais da Associação Mata Ciliar constatou que, dentre as 22 colheitas de sêmen realizadas nessa instituição, a dose da associação tiletamina - zolazepam inicialmente estipulada (5 a 10 mg/kg) em 13 ocasiões (59,1%) não produziu uma sedação satisfatória até o final do procedimento. Em tais ocasiões, a dose de anestésico efetivamente administrado, corrigida para o peso real do animal, foi $7,0 \pm 1,8$ mg/kg (média \pm DP; amplitude - 5 a 9,9 mg/kg), tendo sido necessária a suplementação anestésica por meio da administração de isoflurano a concentrações que variaram de 3 a 5% para a indução e 0,25 a 3 % para a manutenção. Nas demais contenções, em que julgou-se não haver necessidade de suplementação com o anestésico inalatório, foram administrados $8,1 \pm 2,4$ mg/kg (média \pm DP; amplitude - 5 a 10,4 mg/kg) de tiletamina – zolazepam. É importante ressaltar que essa variação na dose efetivamente administrada, não foi proposital, devendo-se à impossibilidade de se estimar com precisão o peso do animal, antes da contenção química; não sendo, no entanto, estatisticamente significativa ($p > 0,1$; teste T) a diferença observada entre o grupo suplementado frente ao não suplementado.

Ao comparar três doses (2,5; 5,0 e 7,5 mg/kg) da associação tiletamina – zolazepam para a contenção de gatos domésticos, Forsyth (1995) verificou bastante variação individual no tempo compreendido entre a administração do anestésico e o reinício dos movimentos voluntários. Os gatos que receberam 5,0 mg/kg levaram entre 15 e 40 minutos para reiniciar a movimentação, enquanto os que receberam

7,5 mg/kg levaram de 21 a 60 minutos. O autor atribuiu tal variação a diferenças no grau de excitação dos gatos antes da contenção.

No presente trabalho o procedimento de eletroejaculação, incluindo o exame geral que o precedia, teve uma duração que variou aproximadamente entre 30 e 60 minutos. Dessa forma, parece lógico verificar que, ao administrar às jaguatiricas doses anestésicas próximas às comparadas por Forsyth (1995), tenha sido necessário suplementar a anestesia apenas em parte dos animais. Pois, ainda que as respostas a esses agentes anestésicos possam ser distintas entre essas espécies, o tempo de retorno dos movimentos voluntários pareceu ser semelhante.

Portanto, o fato de que somente em algumas colheitas julgou-se necessária a suplementação anestésica, provavelmente se deve a variações individuais na susceptibilidade à associação tiletamina – zolazepam, diferenças no grau de excitação de cada indivíduo no momento da administração do anestésico e variações no tempo necessário para completar o procedimento em questão (eletroejaculação) (FORSYTH, 1995; VERSTEGEN et al., 1983), e não apenas às variações na dose administrada.

Outra observação importante quanto ao procedimento anestésico adotado é que não foi possível avaliar o grau de analgesia promovido pelo mesmo, nem tampouco se a eletroejaculação provocou dor, durante ou após a estimulação, de forma direta pela passagem da corrente elétrica através dos tecidos ou indiretamente devido à contração muscular inespecífica. Assim sendo, a avaliação da dor promovida pela eletroejaculação e da eficiência de diferentes protocolos anestésicos na mitigação de qualquer sofrimento que possa advir dessa técnica fica em aberto para futuros estudos que se dediquem especificamente à investigação dessa questão. É necessário ressaltar ainda, a importância desse tema frente à crescente preocupação da nossa sociedade quanto ao bem estar animal e quanto à ética nas condutas de manejo das espécies domésticas e selvagens.

O **protocolo de eletroejaculação** adotado neste estudo consistiu de uma metodologia adaptativa, que visava adequar o grau de estimulação elétrica à resposta ejaculatória de cada indivíduo a cada colheita, tanto em relação ao número de estímulos elétricos aplicados quanto à tensão elétrica desses estímulos (vide **Item 4.1**). O objetivo desse tipo de abordagem foi evitar a estimulação

desnecessária do animal e abreviar o tempo do procedimento, já que as amostras de sêmen a serem utilizadas nos ensaios deveriam apresentar características preestabelecidas quanto a % de espermatozóides móveis, motilidade progressiva, volume e concentração espermática (vide **Item 4.1** e **4.2**). Portanto, os resultados apresentados na **Tabela 5.1.2**, referentes a Volume, Concentração, Total de Espermatozóides e Índice de Motilidade Espermática apresentam um viés primário, pois as amostras a partir das quais esses resultados foram obtidos foram pré-selecionadas em função desses mesmos parâmetros. Por essa razão, eles devem ser considerados com cautela frente às características seminais da espécie descritas na literatura.

Tabela 5.1.2 - Resultados das análises descritivas do sêmen de jaguatiricas em função do experimento (médias \pm DP, exceto quando explicitado de outra forma) – Jundiá / São Paulo – 2002/2003

	Experimentos			Colheitas Descartadas (n = 12/5) ⁽¹⁾	Geral (n = 28/7) ⁽¹⁾
	1 (n = 7/5) ⁽¹⁾	2 (n = 3/3) ⁽¹⁾	3 (n = 6/5) ⁽¹⁾		
Volume Total (ml)	0,71 $\pm 0,54$	0,96 $\pm 1,15$	0,83 $\pm 0,40$	0,51 $\pm 0,41$	0,68 $\pm 0,50$
Volume Espermático (ml)	0,39 $\pm 0,31$	0,42 $\pm 0,49$	0,65 $\pm 0,28$	0,23 $\pm 0,36$	0,40 $\pm 0,36$
Volume Utilizado (ml)	0,31 $\pm 0,27$	0,20 $\pm 0,11$	0,48 $\pm 0,27$	-	0,35 $\pm 0,26$
Concentração Espermática ($\times 10^6$/ml)	226,9 $\pm 271,4$	305,5 $\pm 386,5$	57,9 $\pm 20,9$	574,7 $\pm 1244,0$	283,4 $\pm 633,9$
Total de sptz / Ejaculado ($\times 10^6$)	98,0 $\pm 191,5$	58,4 $\pm 49,9$	43,9 $\pm 16,2$	15,1 $\pm 23,5$	57,8 $\pm 114,7$
IME⁽²⁾	83,9 $\pm 9,9$	81,7 $\pm 10,4$	71,7 $\pm 7,5$	50,0 $\pm 27,1$	71,2 $\pm 21,0$
Colheitas Contamin. / Total (%)⁽³⁾	4 / 9 (44,4%)	3 / 3 (100,0%)	5 / 6 (83,33%)	9 / 10 (90,0%)	21 / 28 (75,0%)
Sub-séries Contamin. / Total (%)⁽⁴⁾	5 / 64 (7,8%)	9 / 20 (45,0%)	13 / 43 (30,2%)	18 / 79 (22,8%)	45 / 206 (21,8%)

⁽¹⁾ n = número de colheitas / número de indivíduos; ⁽²⁾ Índice de Motilidade Espermática (M% + MP \times 20) / 2; ⁽³⁾ número de colheitas contaminadas / número total de colheitas realizadas (proporção de colheitas contaminadas); ⁽⁴⁾ número de sub-séries contaminadas / número total de sub-séries realizadas (proporção de sub-séries contaminadas).

Outro aspecto que deve ser considerado ao se confrontar esses resultados com os dados da literatura, diz respeito às observações de Dooley e Pineda (1986) e Pineda e Dooley (1984), os quais verificaram que a tensão aplicada durante a eletroejaculação de gatos domésticos influencia significativamente o volume de sêmen e número total de espermatozoides ejaculados. Em outro estudo, Pineda, Dooley e Martin (1984) constataram um efeito significativo da seqüência da eletroejaculação, denominada série no presente estudo, sobre esses mesmos parâmetros seminais, verificando maior volume e número de espermatozoides ejaculados na segunda das quatro seqüências de 30 estímulos aplicados nesse estudo. Tais constatações, associadas ao fato de que o incremento da tensão variou entre as colheitas e entre as séries em função da resposta individual aos estímulos, representam outra possível fonte de variação aleatória para os resultados obtidos.

No entanto, a única característica comum a todos os estudos citados acima (DOOLEY; PINEDA, 1986; PINEDA; DOOLEY, 1984; PINEDA; DOOLEY; MARTIN, 1984) foi o fato de que o efeito do animal sobre as características do sêmen foi sempre significativo. Em um desses estudos (PINEDA; DOOLEY, 1984) foi também verificado efeito significativo da interação entre animal e tensão elétrica sobre o número total de espermatozoides ejaculados. Isso significa que há diferença entre os indivíduos na resposta às várias tensões utilizadas durante um protocolo padronizado de eletroejaculação. Esta evidência fornece alguma sustentação para a metodologia adaptativa adotada no presente estudo.

É importante lembrar que as amostras utilizadas para determinação da Concentração Espermática, Total de Espermatozoides por Ejaculado, Índice de Motilidade Espermática e Morfologia Espermática das colheitas que foram utilizadas nos **Experimentos** foram obtidas a partir da mistura das frações que apresentaram as características mínimas de motilidade ($\%M \geq 60$; $MP \geq 3$). Já dentre as Colheitas Descartadas, que não atenderam a esses pré-requisitos, as amostras para determinação desses parâmetros foram obtidas a partir da mistura das frações espermáticas. Vale lembrar que nesses casos o protocolo de eletroejaculação realizado foi exatamente o mesmo descrito por Howard (1993), no entanto os valores de motilidade e produção espermática referentes a esses ejaculados tendem

a ser inferiores à média da população já que representam as piores colheitas do presente estudo.

Os dados referentes ao volume ejaculado são divididos em **Volume Total** (descontadas as frações contaminadas por urina), **Volume Espermático** (descontadas as frações aspérmicas e oligospérmicas) e **Volume Utilizado**, que corresponde à soma das frações que apresentaram % espermatozoides móveis ≥ 60 e motilidade progressiva ≥ 3 . Deve-se observar que em 4 colheitas, uma de cada um dos machos **231**, **241**, **18776** e **22732**, foi obtido apenas plasma seminal. O volume desses ejaculados aspérmicos e oligospérmicos foi considerado apenas para o cálculo das médias de volume total, enquanto para o cálculo das médias dos demais parâmetros essas colheitas foram desconsideradas.

Morais (1999) comenta que o volume total por ela apresentado representa a soma do volume das frações espermáticas, que foi em média 1,4 ml; valor esse bem superior ao volume espermático (0,4 ml) obtido neste estudo. No entanto tal diferença está possivelmente associada ao fato de que o protocolo de eletroejaculação utilizado no presente estudo, ainda que baseado na mesma metodologia utilizada pela autora, foi interrompido ao ser obtida a quantidade mínima de sêmen necessária aos experimentos. Curiosamente, Howard (1993) e Swanson et al. (2003) descrevem médias de volume próximas às obtidas neste estudo (respectivamente; 0,3 e 0,62 ml), ainda que tenham realizado o protocolo de eletroejaculação por completo.

A média geral observada para a **Concentração Espermática** (283,4 milhões/ml) foi bem superior aos valores descritos na literatura por Howard (1993), Morais et al. (2002) e Swanson et al. (2003) – (respectivamente 28,0; 101,2 e 53,8 milhões/ml). Esta diferença pode estar associada com o mesmo aspecto discutido acima para a diferença entre os valores do volume: a interrupção do protocolo de eletroejaculação quando da obtenção da amostra apresentando as características desejadas. Com isso, obteve-se uma amostra de menor volume e mais concentrada, porém com um total de células ejaculadas mais próximo ao que seria esperado para a espécie. Esta hipótese é reforçada pela observação de que o valor médio para o **Total de Espermatozoides por Ejaculado** (57,8 milhões) é intermediário aos valores observados por esses mesmos autores (MORAIS et al., 2002 – 137,9

milhões; HOWARD, 1993 – 8,4 milhões; SWANSON et al., 2003 – 34,2 milhões). Da mesma forma, diferenças bastante acentuadas quanto à concentração e volume espermático foram observadas por Morais et al. (2002) ao comparar as respostas ao mesmo protocolo de eletroejaculação entre a tigrina e a jaguatirica, espécies filogeneticamente bem próximas (EIZIRIK et al., 1998). Também nesse caso, o sêmen menos volumoso e mais concentrado das tigrinas permitiu a obtenção de um total de espermatozóides por ejaculado bem próximo ao das jaguatiricas.

No entanto, caso fosse o propósito do presente estudo avaliar a produção espermática na espécie, a determinação do número de espermatozóides ejaculados deveria estar associada à determinação do número de espermatozóides presentes na urina obtida imediatamente após a colheita. Segundo Dooley et al. (1991), esse procedimento permitiria uma determinação mais acurada do número total de espermatozóides deslocados dos epidídimos e vasos deferentes. Esses autores sugerem tal abordagem, pois verificaram que o fluxo retrógrado de espermatozóides para a vesícula urinária é um componente fisiológico da ejaculação de gatos domésticos, independentemente do método de obtenção do sêmen, ocorrendo inclusive durante a monta natural. Ainda segundo eles, variações acentuadas na quantidade de sêmen obtido de diferentes indivíduos, ou mesmo entre diferentes colheitas de um mesmo indivíduo, podem ser causadas por variações na intensidade desse fluxo retrógrado.

O valor médio para o **Índice de Motilidade Espermática** (71,2) foi intermediário aos valores relatados por Swanson et al. (2003) – 70,7; Howard (1993) – 76,0; e Morais (1999) – 77,5. Vale ressaltar que os valores relatados por Swanson et al. (2003), para essa e para as demais variáveis citadas acima, representam as médias para indivíduos mantidos em cativeiro em diversos zoológicos da América Latina. Dessa forma, esses valores refletem as características esperadas ao exame andrológico de machos cativos de jaguatirica de forma muito mais fidedigna do que as demais publicações, que se basearam em avaliações de um número bastante limitado de colheitas – 5 (HOWARD, 1993) – ou de indivíduos – 3 (MORAIS, 1999).

A determinação da **contaminação por urina** das frações do ejaculado, em diversas ocasiões, foi dificultada pela grande variação na intensidade dessa contaminação. Em tais ocasiões, suspeita-se que um volume de urina muito reduzido

associado àquelas frações, não permitiu que se diagnosticasse a presença de urina com clareza; tendo sido observadas características de pH, volume e coloração intermediárias àquelas de um ejaculado não contaminado e de um ejaculado apresentando considerável quantidade de urina. As frações que foram classificadas como suspeitas de contaminação e, ainda assim, apresentavam proporção de espermatozoides móveis $\geq 60\%$ e motilidade progressiva ≥ 3 , foram imediatamente suspensas no meio PDV na proporção 1:1, visando minimizar os efeitos deletérios da urina aos espermatozoides, tendo sido computadas como frações não contaminadas para efeito da quantificação desse fenômeno. A opção por não descartar essas frações suspeitas do ejaculado pode ser justificada pela observação de Dooley et al. (1991), de que os espermatozoides de gatos domésticos, obtidos por cistocentese realizada imediatamente após a colheita de sêmen, mantêm sua motilidade quando examinados logo após a colheita.

Os resultados das colheitas demonstram uma elevada taxa de contaminação por urina dos ejaculados durante os procedimentos de eletroejaculação. A cada quatro colheitas realizadas, em três delas (75,0%) era obtida ao menos uma fração do ejaculado contaminada; sendo que, do total de 206 frações obtidas, 21,8% foram contaminadas. Essa elevada taxa de contaminação por urina do sêmen de jaguatiricas obtido por eletroejaculação parece ser uma característica típica dessa espécie, já que nossos resultados estão próximos aos observados por Morais (1999) – 69% das colheitas e 24,4% das sub-séries. Nesse mesmo estudo, a autora verifica uma incidência de contaminação mais baixa para o gato do mato pequeno (*Leopardus tigrinus*) – 26,9% das colheitas e 8,9% das sub-séries – e bem mais baixa para o gato maracajá (*L. wiedii*) – uma única fração contaminada em apenas uma dentre as 41 colheitas realizadas. Outra referência à frequência de ocorrência desse fenômeno é feita por Morato et al. (1998), que registraram contaminação de 3,7% dos ejaculados obtidos de onças pintadas mantidas em cativeiro. Da mesma forma, para o gato doméstico a incidência desse fenômeno parece ser baixa, estando claramente associada à aplicação de tensão elétrica excessiva, uma vez que Pineda e Dooley (1984), avaliando o efeito desse parâmetro sobre a resposta à eletroejaculação, verificaram contaminação apenas quando aplicaram a tensão máxima (8 volts). Em outro estudo, em que esses mesmos autores (DOOLEY E

PINEDA, 1986) avaliaram sistematicamente o efeito do método de colheita (eletroejaculação ou vagina artificial) sobre as características seminais dessa espécie, não foi observada contaminação por urina em nenhum dos 40 ejaculados obtidos, não tendo sido encontrada nenhuma indicação da ocorrência desse fenômeno em outros trabalhos que avaliaram as características do sêmen obtido por eletroejaculação nessa espécie (DOOLEY et al., 1991; HOWARD et al., 1988; PLATZ; SEAGER, 1978; POPE; ZHANG; DRESSER, 1991; entre outros).

Segundo Howard (1993), anestésicos inalatórios como o halotano e o isoflurano, além de determinados anestésicos injetáveis como a xilazina, podem relaxar a musculatura que envolve a vesícula urinária, podendo resultar em contaminação do sêmen por urina durante a eletroejaculação. Entretanto, no presente estudo, a proporção média de frações contaminadas por urina, nas colheitas em que a anestesia foi suplementada com isoflurano, foi 18,7% (n=13), valor este inferior, ainda que estatisticamente indiferente, ($p = 0,17$; teste T) ao observado nas colheitas em que se utilizou apenas a associação tiletamina – zolazepam (26,3%; n=12). Contrariando também essas afirmações de Howard (1993) quanto à influência de anestésicos na predisposição à contaminação por urina durante a eletroejaculação, Morais (1999) verificou uma frequência de contaminação mais baixa para o gato maracajá e gato do mato pequeno, contidos por meio da associação quetamina – xilazina, em comparação às jaguatiricas, contidas pelo uso da associação tiletamina – zolazepam. A autora sugere que esses achados poderiam ser atribuídos à provável existência de diferenças na inervação autonômica de controle da ereção e ejaculação dentre os felinos, aventada por Howard (1993). Reforçando ainda este argumento, Benson (1988) afirma que a inervação simpática de toda a região pélvica apresenta marcada variabilidade individual, dentro de uma mesma espécie.

Segundo Shafik (1997), durante o processo fisiológico de ejaculação, há atividade generalizada da musculatura esquelética que pode causar a compressão da vesícula urinária e contaminação do ejaculado por urina. O autor afirma que a contração do Esfíncter Uretral Externo, simultânea à ejaculação, permite evitar tal contaminação; além disso, este esfíncter teria um papel mais complexo na ejaculação, apresentando contrações rítmicas, intercaladas por períodos de

relaxamento, que exerceriam efeito de bomba de sucção e ejeção, permitindo assim a passagem das secreções do Ducto Deferente para Uretra Posterior e desta para a Uretra Peniana. Considerando que há marcada variabilidade entre indivíduos, quanto à inervação autonômica que coordena esse intrincado mecanismo (BENSON, 1988), parece lógico supor que indivíduos ou mesmo espécies, como a jaguatirica, que apresentam maior incidência de contaminação do sêmen por urina na eletroejaculação, possuem particularidades quanto à anatomia dessa inervação autonômica. Tais particularidades implicariam no fato de que as descargas elétricas aplicadas sobre essa aferência autonômica levariam a um incorreto estímulo das contrações rítmicas do Esfíncter Uretral Externo, fundamentais ao processo fisiológico de ejaculação (SHAFIK, 1997). Tal hipótese ainda necessita de comprovação, apesar das observações empíricas que sugerem que tais particularidades anatômicas, associadas ao posicionamento incorreto dos eletrodos (HOWARD, 1993), seriam as principais causas da contaminação do sêmen por urina durante a eletroejaculação.

Os resultados das avaliações da morfologia espermática são expostos na **Tabela 5.1.3**, classificados em função da divisão proposta por Howard (1993) que separa os defeitos em primários e secundários. Nessa tabela também podem ser observadas as proporções dos defeitos nas estruturas espermáticas que deram origem às proporções dos defeitos primários e secundários. Logo abaixo (**Figura 5.1.1**) podem ser observados alguns exemplos dos defeitos espermáticos observados.

Pode-se observar que o número de colheitas avaliadas quanto à morfologia espermática é menor do que o número de exames clínico - andrológicos (**Tabela 5.1.3**) e de colheitas submetidas à análise descritiva (**Tabela 5.1.2**). Isto ocorreu, pois dentre as colheitas computadas nas duas primeiras tabelas, quatro delas foram aspérmicas ou oligospérmicas, não tendo sido assim possível avaliar sua morfologia espermática. Outras três colheitas tiveram suas amostras em formol salino perdidas devido à formação de grumos que inviabilizaram a observação da morfologia dos espermatozóides. Possivelmente, tais grumos estiveram associados a ejaculados muito concentrados, que apresentaram grande quantidade de debris celular.

A classificação dos defeitos espermáticos em primários e secundários baseia-se na origem desses defeitos, sendo os primários originados durante a espermatogênese e os secundários durante o transporte, maturação no epidídimo ou mesmo devido à manipulação incorreta do ejaculado (BARTH; OKO, 1989; HOWARD et al., 1984; WILDT, 1996). No entanto, segundo Wildt (1996) tais idéias sobre as origens exatas de determinados defeitos espermáticos têm sido questionadas. O autor sugere ainda que alguns defeitos primários poderiam originar-se durante o transporte dos espermatozóides, enquanto alguns defeitos secundários poderiam ocorrer durante a espermatogênese.

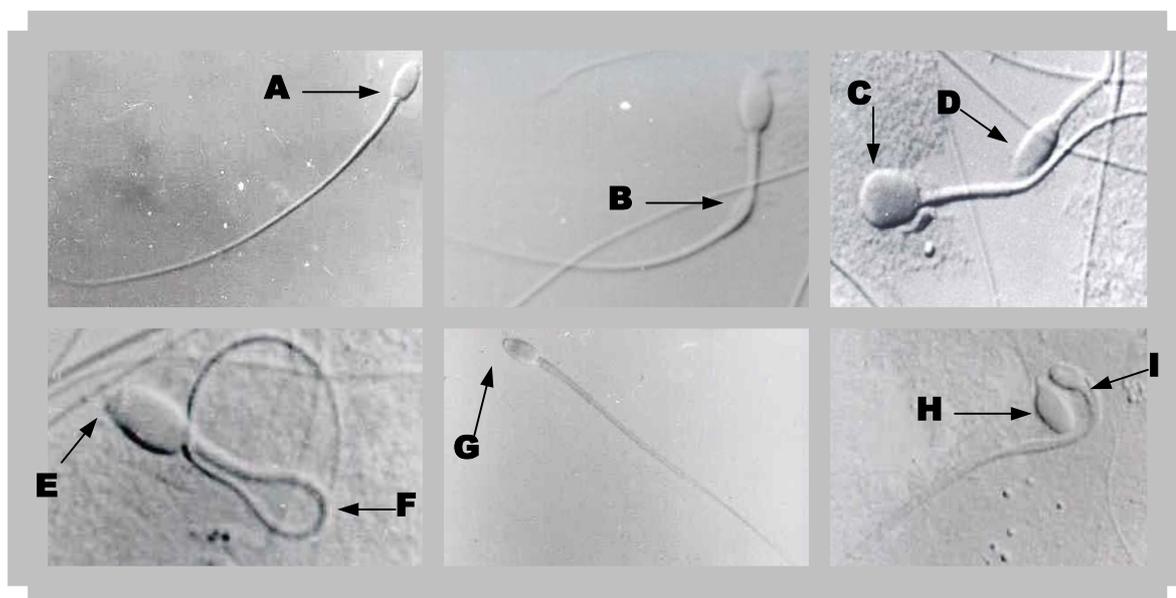


Figura 5.1.1 - Morfologia espermática em jagatiricas: **A** - Espermatozóide s/ alteração morfológica; **B** - gota citoplasmática distal; **C** - macrocefálico; **D** - cabeça estreita; **E** - "Knobbed"; **F**- peça intermediária dobrada; **G**- acrossomo protuso; **H** - cabeça solta e aumentada; **I** - microcefálico c/ peça intermediária dupla. Fotomicrografias realizadas durante avaliação de amostras fixadas em formol salino, preparadas em câmara úmida, sob microscopia de contraste de interferência diferencial em microscópio Olympus BX50, utilizando lente objetiva apocromática de aumento igual a 100x. Jundiaí / São Paulo, 2002

Tabela 5.1.3 - Morfologia espermática das jaguatiricas em função do experimento (médias \pm desvio padrão) – Jundiá / São Paulo – 2002 / 2003

		Experimentos			Colheitas Descartadas (n = 12/5) ⁽¹⁾	Geral (n = 28/7) ⁽¹⁾
		1 (n = 7/5) ⁽¹⁾	2 (n = 3/3) ⁽¹⁾	3 (n = 6/5) ⁽¹⁾		
Espermatozoides Normais (%)		65,8 \pm 20,8	58,3 \pm 19,4	70,8 \pm 9,0	46,7 \pm 29,8	61,4 \pm21,7
P R I M Á R I O S	Acrossomo danificado	0,6 \pm 0,7	1,2 \pm 1,0	-	0,1 \pm 0,2	0,4 \pm0,7
	Acrossomo protuberante	2,0 \pm 2,2	0,7 \pm 0,8	1,4 \pm 1,6	1,1 \pm 1,5	1,4 \pm1,7
	Knobbed sperm	1,1 \pm 1,6	1,2 \pm 1,3	0,7 \pm 0,7	-	0,8 \pm1,2
	Defeitos de cabeça ⁽²⁾	2,0 \pm 1,4	2,0 \pm 2,2	1,2 \pm 1,0	2,0 \pm 2,4	1,8 \pm1,6
	Peça intermediária disforme	0,2 \pm 0,4	0,3 \pm 0,3	0,2 \pm 0,3	0,2 \pm 0,4	0,2 \pm0,3
	Cauda fortemente enrolada	3,1 \pm 3,0	9,5 \pm 7,7	1,6 \pm 1,1	6,9 \pm 10,3	4,6 \pm6,2
	Sub-total	9,2 \pm 5,8	14,8 \pm 10,8	5,1 \pm 2,3	11,1 \pm 9,3	9,5 \pm7,2
S E C U N D Á R I O S	Acrossomo destacado	0,6 \pm 1,8	0,2 \pm 0,3	0,8 \pm 0,6	0,1 \pm 0,2	0,5 \pm 1,1
	Defeitos de colo ⁽³⁾	4,4 \pm 3,3	1,0 \pm 0,5	1,8 \pm 1,6	2,5 \pm 2,7	2,9 \pm 2,8
	Gota proximal	0,5 \pm 0,5	0,7 \pm 0,6	0,2 \pm 0,3	2,0 \pm 2,9	0,8 \pm1,5
	Gota distal	4,2 \pm 9,3	3,0 \pm 4,4	4,1 \pm 4,2	0,8 \pm 1,3	3,2 \pm6,2
	Peça intermediária dobrada s/ gota	2,6 \pm 2,4	7,0 \pm 3,3	2,6 \pm 1,6	4,9 \pm 6,5	3,8 \pm3,9
	Peça intermediária dobrada c/ gota	0,1 \pm 0,3	1,5 \pm 2,6	-	-	0,3 \pm1,0
	Cauda enrolada	6,3 \pm 14,1	0,7 \pm 0,8	1,6 \pm 1,5	1,4 \pm 1,1	3,2 \pm8,8
	Fratura de cauda	0,1 \pm 0,2	-	0,2 \pm 0,3	0,4 \pm 0,5	0,2 \pm0,3
	Cauda dobrada s/ gota	5,6 \pm 4,4	11,2 \pm 9,3	9,2 \pm 3,1	21,1 \pm 24,0	10,9 \pm13,1
	Cauda dobrada c/ gota	0,7 \pm 0,8	1,7 \pm 2,9	3,6 \pm 4,0	9,0 \pm 11,1	3,5 \pm6,3
Sub-total	25,0 \pm 17,7	26,8 \pm 9,9	24,1 \pm 7,8	42,2 \pm 24,5	29,2 \pm17,6	
Total de defeitos	34,2 \pm20,8	41,7 \pm19,4	29,2 \pm9,0	53,3 \pm29,8	38,6 \pm21,7	

⁽¹⁾ n = número de colheitas / número de indivíduos. ⁽²⁾ Cabeça dupla, superfície anormal e alterações de tamanho ou de forma. ⁽³⁾ Cabeça solta normal e inserção oblíqua, abaxial, paraxial ou retroaxial.

Ainda assim, alguns aspectos interessantes desse sistema de classificação não podem ser desconsiderados. Alguns defeitos classificados como secundários, como a retenção da gota citoplasmática na cauda ou na peça intermediária, estão fortemente associados à falha no processo de maturação epididimária, cuja etiologia pode estar ligada a termorregulação testicular deficiente, trauma ou processos infecciosos, entre outras causas (BARTH; OKO, 1989). Certos defeitos de cauda, como cauda dobrada ou enrolada, podem ter essa mesma origem ou ainda serem devidos a choque térmico ou osmótico durante a ejaculação e manipulação do sêmen (AXNÉR; STRÖM-HOLST; LINDE-FORSBERG, 1998; BARTH; OKO, 1989). Isso implica que o mesmo indivíduo, mantido sob diferentes condições de manejo ou tendo seu sêmen avaliado por examinadores distintos, tende a apresentar maior variação nos defeitos ditos secundários do que naqueles classificados como primários.

Paz (2000) utilizou o sistema de classificação proposto por Blom (1950), pelo qual a autora classificou os defeitos espermáticos em maiores e menores. O princípio desse sistema de classificação, segundo a autora, é basicamente o mesmo do adotado no presente estudo, podendo-se verificar que os defeitos por ela classificados como maiores e menores, correspondem respectivamente aos que neste estudo foram considerados como primários e secundários. Por meio da correção da dieta de onças pintadas mantidas em cativeiro, Paz (2000) verificou uma diminuição significativa da proporção de defeitos maiores, mas não dos menores, concluindo que a dieta inadequada pode ser responsável por falhas na espermatogênese desses animais e ser fator determinante da má qualidade espermática de animais cativos.

Outro aspecto que não pode deixar de ser considerado ao se observar os resultados do presente estudo é o fato de que Axnér, Ström e Linde-Forsberg (1997), ao comparar dois ejaculados colhidos seqüencialmente por eletroejaculação de gatos domésticos, verificaram que a proporção de gotas citoplasmáticas e caudas enroladas é menor no segundo ejaculado em comparação ao primeiro. Esses dois ejaculados avaliados correspondem exatamente ao que foi denominado no presente estudo de primeira e segunda fração do ejaculado. Frente a essa constatação é importante considerar, conforme foi descrito detalhadamente no **Item 4.1**, que nas colheitas do presente estudo foram obtidas uma, duas ou três frações, dependendo da resposta de cada indivíduo, e, além disso, dependendo das características de cada

uma dessas frações, elas podiam ou não ser combinadas para a obtenção da amostrada fixada para exame da morfologia espermática. Nesse mesmo sentido é importante notar que Dooley e Pineda (1986) verificaram um efeito significativo da voltagem sobre a osmolaridade do sêmen obtido de gatos domésticos. Em outro trabalho, Axné, Ström-Holst e Linde-Forsberg (1998) verificaram que espermatozoides obtidos por eletroejaculação apresentam uma proporção significativamente maior de defeitos de flagelo (dobrado e enrolado) do que espermatozoides removidos da cauda do epidídimo, sugerindo que essa diferença pode ser devida a alterações na osmolaridade associadas à mistura dos espermatozoides ao plasma seminal durante a ejaculação. Pode-se observar que todas essas alterações discutidas acima (cauda dobrada ou enrolada e retenção da gota citoplasmática) correspondem a defeitos classificados como secundários. Portanto, se analisadas em conjunto, as observações desses trabalhos (AXNÉR; STRÖM; LINDE-FORSBERG, 1997; 1998; DOOLEY; PINEDA, 1986) indicam que as variações do protocolo de ejaculação do presente estudo podem ter influenciado a proporção de defeitos espermáticos secundários. Em função dessas variações, poderiam ser esperadas diferenças nas proporções dos defeitos secundários, mas não dos primários, entre os resultados do presente estudo e de outros estudos que se valeram de protocolos de eletroejaculação padronizados.

No entanto, a despeito dessas considerações, a proporção de defeitos primários verificada no presente estudo – 9,5% – foi 2,4 vezes maior que aquela verificada por Morais et al. (2002) – 4,0%; diferença essa que foi semelhante para os defeitos secundários, que foram 2,3 vezes mais freqüentes no presente estudo – 29,2% – que no estudo de Morais et al. (2002) – 12,7%. Porém, ao se comparar tais resultados com os valores encontrados por Swanson et al. (2003) para a proporção de defeitos maiores e menores do sêmen de jaguatiricas mantidas em zoológicos da América Latina – respectivamente, 7,7% e 32,5% – pode-se notar que os valores obtidos no presente estudo estão mais próximos dos valores médios observados para indivíduos cativos na América Latina. Tendo em vista esses resultados, pode-se sugerir que aparentemente as alterações no método de colheita não implicaram em alterações na morfologia espermática, tanto em relação à proporção de defeitos primários quanto de secundários.

Conforme foi amplamente discutido por Paz (2000) e Swanson et al. (2003) a dieta fornecida aos felídeos, pela maioria dos zoológicos do Brasil e do restante da América Latina, composta principalmente por pescoço de frango e músculo bovino, apresenta uma relação cálcio / fósforo inadequada e baixos níveis de vitaminas A, D e E. Esses autores apontam essa deficiência alimentar como uma importante causa do elevado nível de defeitos espermáticos no sêmen desses animais. Em seu estudo de felídeos neotropicais cativos em zoológicos latino-americanos, Swanson et al. (2003) verificaram que indivíduos mantidos sob uma dieta desbalanceada apresentam proporção significativamente maior ($p = 0,01$) de defeitos espermáticos em comparação a indivíduos que recebem uma alimentação balanceada de acordo com suas exigências nutricionais. Howard (1993) verificou em média 80,8% de espermatozoides normais, entre os cinco ejaculados de jaguatiricas mantidas em cativeiro que foram avaliados em seu trabalho. A autora não revela a composição da dieta dos animais estudados, porém muito provavelmente trata-se de um ou mais indivíduos mantidos em zoológicos norte-americanos, os quais fornecem dietas corretamente balanceadas (SWANSON et al., 2003).

Apesar dos esforços da Associação Mata Ciliar em fornecer presas inteiras aos animais lá alojados, o pescoço de frango foi o principal item da dieta dessas jaguatiricas. Assim essa dieta caracterizou-se como deficiente, da mesma forma que a dieta fornecida pela maioria dos zoológicos latino-americanos. Moraes et al. (2002) destaca a importância do manejo adequado a que foram submetidos os animais de seu experimento; não só com relação à nutrição, mas também em relação às condições sociais e de recinto. A autora sugere que esse manejo correto foi a principal causa de algumas das características andrológicas dos animais avaliados pela autora terem sido superiores às de outros trabalhos como o de Howard (1993) e o de Swanson et al. (1995). Isto parece também ter ocorrido em relação ao presente estudo. Os animais mantidos na Fundação Parque Zoológico de São Paulo, apesar de receberem uma dieta balanceada, eram mantidos em recintos menos favoráveis, já que um indivíduo estava exposto a intensa visitação, enquanto o outro eram mantido em recinto do setor extra, com piso de concreto e poucos itens de ambientação.

Resumidamente, pode-se afirmar que os resultados das colheitas foram em geral intermediários aos valores reportados na literatura para as características

seminais da jaguatirica, indicando que as diferenças no método de colheita utilizado não implicaram em alterações significativas nos parâmetros espermáticos, exceto pela concentração espermática cujo valor obtido foi de 2,8 a 10 vezes maior que os demais valores encontrados na literatura.

5.2 EXPERIMENTO 1: Estudo do transporte e da criocapacitação espermática

A curva de resfriamento proporcionada pelo Equitainer Modificado foi aferida no laboratório, em condições controladas. No lugar do sêmen, foi mantida uma amostra de 1 ml do meio PDV, cuja temperatura foi anotada a cada 5 minutos. A velocidade de resfriamento obtida foi de $0,239^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$; e a curva resultante pode ser observada na **Figura 5.2.1**.

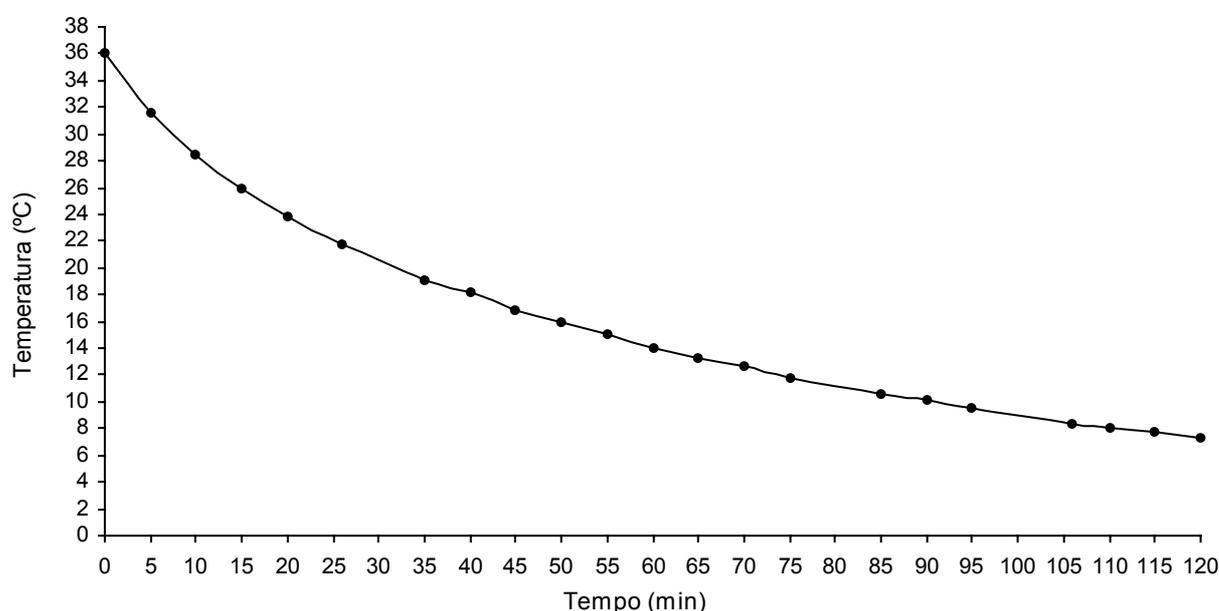


Figura 5.2.1 - Curva de resfriamento do Equitainer Modificado. São Paulo, 2002

Visando investigar a variação da temperatura nas condições de campo, durante o transporte das amostras de sêmen entre Jundiaí e São Paulo, a temperatura da água no interior do sistema, após o período de transporte (2 horas) foi aferida, sendo, em média, $9,71^{\circ}\text{C}$. Subtraindo esse valor da temperatura do banho-maria (37°C), temperatura na qual o sêmen se encontrava antes do início do transporte, chegamos à variação média da temperatura (Δt), $27,29^{\circ}\text{C}$. A taxa de resfriamento média, determinada nas condições reais de transporte, pôde então ser obtida, dividindo a variação média da temperatura pelo intervalo de tempo (120 minutos). O valor obtido foi $0,227^{\circ}\text{C}/\text{min}$, muito próximo daquele aferido em condições controladas ($0,239^{\circ}\text{C}/\text{min}$).

As alterações realizadas no modelo de Equitainer™ disponível comercialmente, para a elaboração do Equitainer Modificado, objetivaram proporcionar uma taxa de resfriamento mais rápida do que aquela descrita para a versão original do equipamento, $\sim 0,03^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (DOUGLAS-HAMILTON et al., 1984); já que ao resfriar o sêmen por duas horas numa taxa como essa, a temperatura final seria apenas $3,6^{\circ}\text{C}$ menor que a temperatura inicial. Isso ocorre pois esse equipamento foi inicialmente desenvolvido para a manutenção do sêmen por ao menos 12 horas e sua utilização por um intervalo tão reduzido como 2 horas, provavelmente não implicaria em alterações significativas na da viabilidade dos espermatozóides em comparação à manutenção do sêmen à temperatura ambiente durante esse mesmo período tempo.

As médias dos resultados obtidos quanto ao Índice de Motilidade Espermática e Integridade Acrossomal, tanto para as amostras avaliadas antes do período de transporte, quanto para as avaliadas depois desse período, são apresentadas abaixo, na **Figura 5.2.2**. Como se pode observar por esses gráficos, a perda da integridade acrossômica devida ao resfriamento foi evidente, já que houve uma proporção significativamente menor ($p = 0,0107$) de espermatozóides com acrossomos íntegros nas amostras resfriadas em comparação com aquelas mantidas a temperatura ambiente.

Pukazhenth et al. (1999) compararam três velocidades para o resfriamento do sêmen de gatos domésticos e verificaram que a mais lenta dentre essas velocidades proporcionou o menor índice de lesão às membranas acrossomais, concluindo que “a diminuição da taxa de resfriamento inicial diminui sensivelmente o dano estrutural nos espermatozóides”. A velocidade de abaixamento da temperatura obtida com o Equitainer Modificado ($0,23^{\circ}\text{C}/\text{min}$) foi ainda mais lenta que a menor taxa testada por esse autor ($0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$). Ainda assim, no presente experimento, a refrigeração causou sérios danos às membranas acrossomais, o que implica em redução da habilidade fecundante dos espermatozóides, dada a crucial importância dessas membranas para a reação acrossômica e penetração do oócito (YANAGIMACHI, 1994). Nesse sentido, Pope et al. (1989) demonstraram que uma taxa ainda mais lenta de refrigeração ($\sim 0,2^{\circ}\text{C}/\text{min}$) do sêmen de gatos domésticos promoveu uma redução significativa na proporção de danos às membranas acrossomais, permitindo uma taxa de fecundação *In vitro* próxima a 75%, significativamente mais elevada do

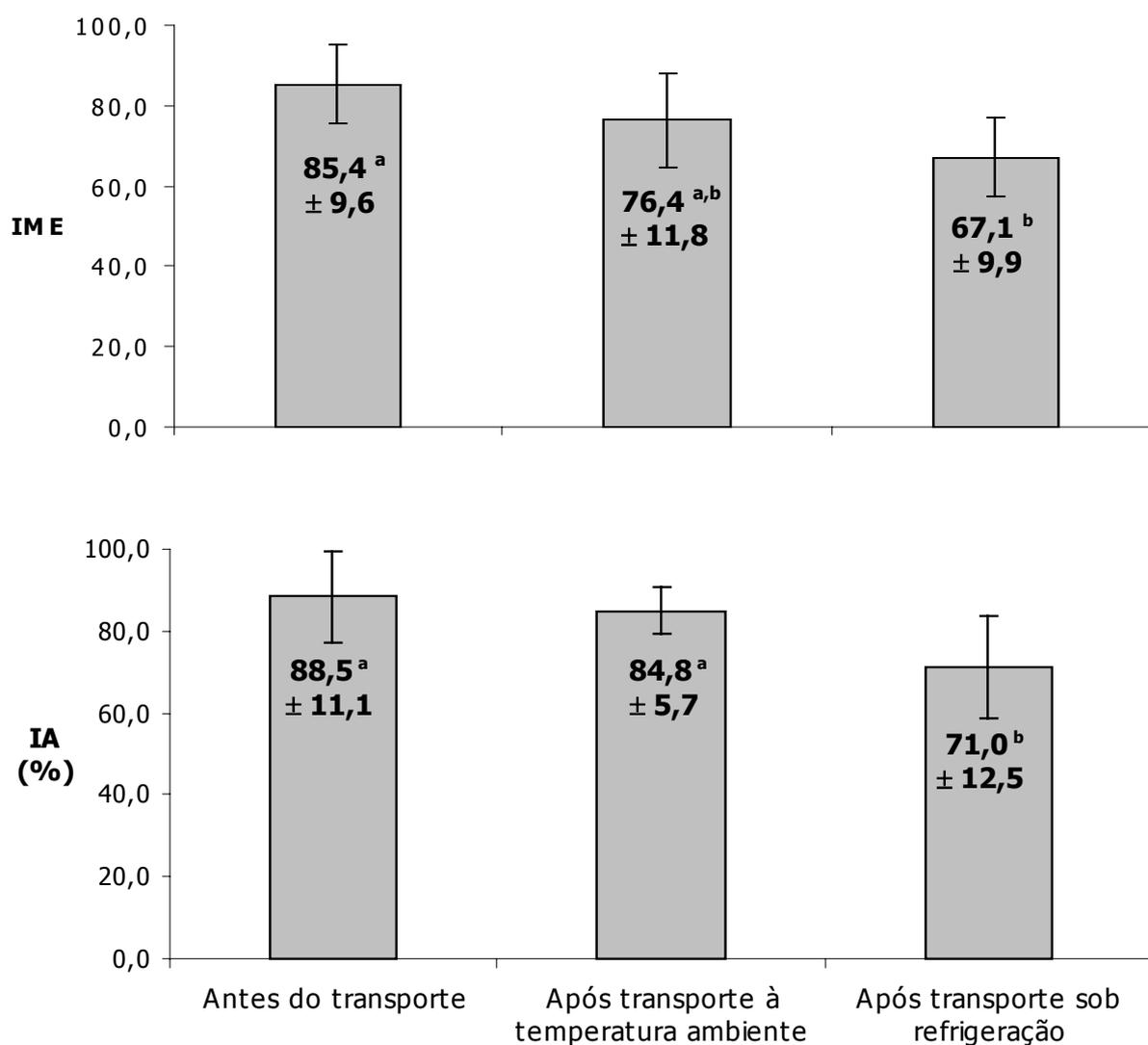


Figura. 5.2.2. - Efeito do transporte sob refrigeração ou à temperatura ambiente sobre as médias (\pm DP) do Índice de Motilidade Espermática (**IME**) e da integridade acrossomal (**IA**) ($n = 5$ animais / 7 ejaculados). ^a, ^b Letras sobrescritas diferentes em um mesmo gráfico, indicam diferenças significativas ($p < 0,05$; ANOVA, "Microsoft® Excel"). Jundiaí / São Paulo, 2002

que a obtida com sêmen refrigerado pelos métodos convencionais ($\sim 4^{\circ}\text{C}/\text{min}$, PUKAZHENTHI et al., 2000).

Além disso, o declínio no Índice de Motilidade Espermática devido à refrigeração, não observado para o grupo mantido à temperatura ambiente no presente experimento, permite especular que a função de todas as membranas lipoprotéicas dos espermatozóides possivelmente foi danificada pelo assim chamado Choque do Resfriamento ("Cold Shock", para referências veja WATSON, 1995). Porém, Pukazhenthhi et al. (1999), no mesmo estudo discutido acima, não verificaram efeito da refrigeração sobre a motilidade dos espermatozóides obtidos por

eletroejaculação de gatos domésticos, independentemente da taxa de resfriamento utilizada. Esse resultado contraria também as observações de Glover e Watson (1985) que verificaram que o sêmen do gato doméstico, obtido por vagina artificial, é bastante sensível ao Choque do Resfriamento, sofrendo perdas irreversíveis na motilidade espermática. Pukazhenthí et al. (1999), especularam que a discrepância entre os resultados desses dois estudos se deve às diferenças na composição do plasma seminal associadas aos diferentes métodos de colheita do sêmen. Tal hipótese parece também plausível para explicar a diferença quanto à sensibilidade ao Choque do Resfriamento, verificada entre o estudo de Pukazhenthí et al. (1999) e o presente estudo. Pois, assim como o sêmen obtido por vagina artificial, o ejaculado obtido pelo protocolo adaptativo de eletroejaculação, utilizado no presente estudo, levou à obtenção de concentração espermática mais elevada do que aquela obtida pelo protocolo convencional de eletroejaculação.

Em seu estudo, Pukazhenthí et al. (1999) sugerem haver uma distinção entre o Choque do Resfriamento e os danos às membranas acrossomais, sugerindo que os felídeos seriam caracteristicamente mais resistentes ao Choque do Resfriamento pelo fato de não terem observado efeito do resfriamento sobre a motilidade espermática, ainda que a integridade acrossomal tenha sido severamente afetada pelo abaixamento da temperatura. Watson (1995) discute extensivamente os efeitos do Choque do Resfriamento sobre espermatozóides de mamíferos, afirmando que células sensíveis a esse fenômeno “demonstram uma perda de integridade de membrana e de função celular ao serem rapidamente resfriadas no intervalo entre 0 e 20°C”; não limitando a manifestação desse choque à mera redução da motilidade espermática.

Outra constatação importante do estudo de Pukazhenthí et al. (1999), que pode ajudar a compreender esta eventual diferença na sensibilidade ao Choque do Resfriamento, consiste da observação de que o sêmen de gatos teratospérmicos (que produzem mais de 60% de espermatozóides com alterações morfológicas) é significativamente mais sensível ao resfriamento no que diz respeito à longevidade após o reaquecimento, quando comparado ao sêmen de gatos normospérmicos (que produzem menos de 40% de espermatozóides com alterações morfológicas). Com isso, esse autor demonstrou que espermatozóides produzidos por diferentes

populações de uma mesma espécie podem responder de maneira bastante distinta aos efeitos deletérios do resfriamento. Tal diferença de sensibilidade é ainda mais pronunciada ao se comparar o sêmen de diferentes espécies; como o de seres humanos, que é bastante resistente, e o de carneiros, bastante sensível (WATSON, 1995).

Apesar das jaguatiricas do presente experimento terem produzido mais de 60% de espermatozóides normais, pode-se especular que a maior sensibilidade ao Choque do Resfriamento, em comparação ao gato doméstico, consiste de uma característica do sêmen dessa espécie. Esse argumento é reforçado pelas observações de Swanson et al. (1996) que, ao congelar sêmen de jaguatiricas por meio do mesmo protocolo utilizado com sucesso para a criopreservação do sêmen de gatos domésticos, verificou uma redução da motilidade determinada imediatamente após a colheita, entre 85 e 90%, para valores pós-descongelamento entre 40 e 60%.

Vale notar que todas as outras condições de transporte, além da temperatura, foram idênticas entre o grupo refrigerado e o transportado à temperatura ambiente. Dentre essas variáveis, o diluidor selecionado (PDV) é geralmente preconizado em estudos que envolvem o resfriamento do sêmen, devido à presença da gema de ovo, importante para a proteção das membranas espermáticas contra o Choque do Resfriamento (PUKAZHENTHI et al., 1999; WATSON, 1995). Já em estudos envolvendo a manutenção do sêmen à temperatura ambiente, geralmente são preconizados meios de cultivo celulares convencionais (HOWARD, 1993). Em suma, verifica-se que, apesar das variáveis do transporte terem sido pré-determinadas visando obter as melhores condições possíveis para o transporte sob refrigeração, este se demonstrou mais deletério à viabilidade e integridade de membranas dos espermatozóides da jaguatirica do que a manutenção sêmen à temperatura ambiente.

Esses resultados estão de acordo com os obtidos pelo estudo de Morato et al. (2003) em relação às condições de processamento do sêmen de diversas espécies de felídeos neotropicais (incluindo a jaguatirica), antes do congelamento. Os autores compararam a eficiência de um diluidor a base de gema de ovo (meio Tes com Tris - TEST) com a do meio F10 de Ham, para a manutenção do sêmen por três horas, tanto para amostras que foram refrigeradas lentamente quanto para aquelas que

foram mantidas à temperatura ambiente (25°C). O diluidor TEST foi mais eficiente na manutenção da motilidade e da integridade acrossomal do que o meio F10 de Ham, corroborando os resultados de Pukazhenthil et al. (1999) ao demonstrar mais uma vez a predileção do sêmen felino por diluidores a base de gema de ovo. Tal como no presente estudo, Morato et al. (2003) concluíram que a manutenção do sêmen felino à temperatura ambiente em diluidor a base de gema de ovo é a forma mais apropriada de processamento do sêmen antes do início da criopreservação.

No entanto, vale notar que em um estudo recente Harris et al. (2001) demonstraram que ao utilizarem uma taxa reduzida de resfriamento inicial para a manutenção do sêmen de gatos domésticos à temperatura de geladeira (4°C), em um meio a base de gema de ovo, foi possível recuperar, após 5 dias, 50% de espermatozoides móveis e mais de 80% de acrossomos intactos. Esse estudo dá indícios de que para a manutenção do sêmen por intervalos de tempo mais prolongados do que o período de transporte avaliado no presente estudo, a refrigeração do mesmo pode ser mais vantajosa frente a sua manutenção à temperatura ambiente.

O Equitainer Modificado proporcionou uma taxa de resfriamento próxima a valores que têm demonstrado serem bastante eficientes na manutenção da fertilidade de espermatozoides de gatos (POPE et al., 1989) e cães domésticos (BOUCHARD et al., 1990). Portanto, estudos futuros visando o desenvolvimento de técnicas de manutenção a médio e longo prazo, do sêmen de espécies carnívoras obtido em condições de campo, poderão se valer desse modelo de equitainer[®] para o resfriamento inicial dos espermatozoides. Vale lembrar que é possível ter-se algum controle sobre a taxa de resfriamento, alterando-se o volume de água utilizado no banho refrigerado.

Outro aspecto importante com relação à manipulação do sêmen no presente experimento, envolve a separação do plasma seminal por meio da **lavagem do sêmen**. Howard (1993) demonstrou que a lavagem do sêmen de gatos maracajá imediatamente após a colheita, por meio da centrifugação e ressuspensão na solução de Tyrode, permite a manutenção da motilidade espermática por um período de tempo mais prolongado do que a manutenção das células na presença do plasma seminal puro ou apenas diluído naquele mesmo meio. Muitos estudos envolvendo as

condições de manipulação do sêmen de felídeos preconizam a remoção do plasma seminal imediatamente após a colheita (DONOGHUE, et al., 1992; LONG et al., 1996; PUKAZHENTHI et al., 1999; SWANSON et al., 1996; entre outros). No entanto, foi demonstrado que os espermatozoides de gatos domésticos (HOWARD; BUSH; WILDT, 1991), suçuaranas (MILLER et al., 1990) e tigres (BYERS et al., 1989) são capazes de interagir *In vitro* com oócitos homólogos após a simples diluição do sêmen em meios de cultivo convencionais.

Amostras de sêmen destinadas à inseminação artificial requerem lavagem para remoção do plasma seminal, devido à presença de microorganismos no mesmo, como vírus e bactérias, que são removidos por esse processo, diminuindo o risco de desenvolvimento de endometrite ou de transmissão de moléstias infecciosas pela deposição desses microorganismos diretamente no útero (HOWARD, 1999). No entanto a centrifugação, necessária para a separação das células espermáticas, é um conhecido indutor da capacitação espermática, reduzindo dessa forma a longevidade dos espermatozoides (HARRISON, 1996; CENTOLA et al., 1998; YANAGIMACHI, 1994).

Como estava entre os objetivos do presente estudo a avaliação da influência das condições de manipulação do sêmen sobre a capacitação espermática *In vitro*, optou-se por realizar a lavagem para remoção do plasma seminal após o transporte, ou seja, imediatamente antes do início do período de incubação para avaliação da resposta ao estímulo do cálcio ionóforo. Além disso, como foi mencionado no início desse trabalho, os criatórios e zoológicos onde podem ser encontrados animais da espécie ora estudada geralmente não dispõem dos equipamentos necessários à manipulação do sêmen, entre eles uma centrífuga adequada à lavagem do sêmen. Na Associação Mata Ciliar, onde foi colhido o sêmen utilizado neste experimento, as condições não foram diferentes; representando, portanto, de forma fiel as dificuldades logísticas que devem ser encontradas na aplicação prática das técnicas de reprodução assistida como inseminação artificial e fecundação *In vitro* nas espécies selvagens; objetivo final do desenvolvimento das técnicas ora estudadas.

A lavagem após o período de transporte para a remoção do plasma seminal e do meio PDV, seguida pela ressuspensão no meio F10 de Ham, apresentou uma tendência estatística ($p = 0,070$, teste T pareado) a reduzir o valor do índice de

motilidade espermática no sêmen transportado à temperatura ambiente, tendência essa que não foi observada para o sêmen refrigerado (**Tabela 5.2.1**). Visando determinar a origem dessa tendência, o efeito da lavagem sobre a motilidade progressiva das amostras refrigeradas e mantidas à temperatura ambiente foi comparado por meio do cálculo das diferenças nos valores pré e pós lavagem; verificando-se que esse efeito foi significativamente menor ($p = 0,041$, teste T pareado) para a motilidade progressiva dos espermatozóides transportados à temperatura ambiente ($-0,7 \pm 1,1$) em comparação aos transportados sob refrigeração ($0,1 \pm 0,9$).

Tabela 5.2.1 - Médias (\pm DP) dos parâmetros de motilidade espermática antes e depois da lavagem do sêmen da jaguatirica para remoção do plasma seminal e do meio PDV, seguida pela ressuspensão no meio F10 de Ham. Jundiá / São Paulo, 2002

	Temperatura ambiente		Refrigerado	
	Pré lavagem	Pós lavagem	Pré lavagem	Pós lavagem
Índice de Motilidade Espermática	76,4* $\pm 11,8$	63,6* $\pm 14,9$	67,1 $\pm 9,9$	65,7 $\pm 11,0$
% Espermatozóides Móveis	72,9 $\pm 17,0$	61,4 $\pm 18,6$	64,3 $\pm 15,1$	60,0 $\pm 15,3$
Motilidade Progressiva	4,0* $\pm 0,6$	3,3* $\pm 1,0$	3,5 $\pm 0,5$	3,6 $\pm 1,0$

*Valores assinalados com asteriscos na mesma linha apresentaram tendência estatística a diferirem entre si ($0,1 > p > 0,05$, teste T pareado)

Os resultados acima indicam que a lavagem do sêmen produziu um discreto aumento do valor da Motilidade Progressiva das amostras refrigeradas; efeito esse que, apesar de não ter sido estatisticamente significativo ($p > 0,1$; teste T pareado), diferiu significativamente do efeito produzido por essa etapa do processamento nas amostras mantidas à temperatura ambiente, sobre as quais a lavagem apresentou uma tendência ($p = 0,070$; teste T pareado) a reduzir o valor da Motilidade Progressiva.

Tais resultados devem ser encarados com cautela, dado o fato de que a Motilidade Progressiva é um parâmetro bastante subjetivo, já que representa uma escala arbitrária de notas atribuídas ao padrão de movimentação predominante entre

as células espermáticas, como foi descrito em detalhe no **Item 4.2**. Além disso, conforme foi também discutido anteriormente, tanto a centrifugação (CENTOLA et al., 1998) como a refrigeração (BAILEY; BILODEAU; CORMIER, 2000) podem ocasionar alterações nas células espermáticas bastante semelhantes às observadas nos espermatozoides capacitados, sendo que uma das características fisiológicas dos espermatozoides capacitados é a modificação do padrão de movimentação, sendo esse processo denominado hiperativação. Esse padrão de movimentação característico da hiperativação consiste basicamente de um aumento da intensidade dos movimentos flagelares dos espermatozoides com diminuição da progressão linear (YANAGIMACHI, 1994). A ocorrência desse padrão de movimentação foi registrada entre algumas amostras avaliadas imediatamente após a centrifugação e ressuspensão dos espermatozoides, no entanto tal avaliação mostrou-se também bastante subjetiva. Nesse sentido, Harrison (1996) afirma que existe uma grande heterogeneidade funcional entre as células de uma dada população espermática, as quais apresentam diferentes requerimentos para indução da capacitação. Segundo o autor, essa heterogeneidade impõe sérias dificuldades na avaliação de parâmetros característicos da capacitação, tais como a observação de movimento hiperativado, em toda a população espermática num dado momento.

A avaliação do padrão de movimentação dos espermatozoides pode ser realizada de forma muito mais objetiva do que pela simples observação ao microscópio, utilizando-se do sistema de Análise Espermática Assistida por Computador (CASA), que quantifica parâmetros como velocidade linear, curvilínea, deslocamento lateral de cabeça, entre outros. A partir do estudo das características das trajetórias de espermatozoides humanos isolados, foram desenvolvidos algoritmos que permitem a quantificação de células apresentando movimento característico de hiperativação por esses sistemas de análise espermática computadorizada (IRVINE, 1995). Valendo-se desse tipo de análise, Centola et al. (1998) verificaram aumentos significativos tanto no índice de hiperativação quanto nas velocidades padrão e progressiva atribuídos à lavagem das células espermáticas em diferentes gradientes de densidade. Esse achado corrobora os resultados do presente experimento, permitindo supor que a diferença no efeito da centrifugação entre as amostras refrigeradas e as não refrigeradas pode ter sido devida à indução

da capacitação pelo processo de refrigeração e centrifugação, que teriam levado a um aumento concomitante da proporção de células hiperativadas e da velocidade de deslocamento dos espermatozoides, efeito esse não observado para as amostras mantidas à temperatura ambiente. De acordo com a definição de hiperativação de Yanagimachi (1994), o aumento da progressão e da taxa de espermatozoides hiperativados parece representar uma contradição, porém vale lembrar que isso pode ter sido causado pela heterogeneidade inerente à população espermática.

Outro importante parâmetro avaliado após o transporte foi a variação do Índice de Motilidade Espermática durante as quatro horas de pré-incubação (**Figura 5.2.3**). Não pôde ser verificada diferença significativa ($p > 0,05$, teste T pareado) entre os valores do índice de motilidade espermática para o sêmen transportado à temperatura ambiente em comparação ao refrigerado, tanto para os dados analisados como um todo como para cada tempo separadamente. No entanto, a queda do índice de motilidade espermática durante as quatro horas de pré-incubação foi significativamente maior ($p = 0,03$; teste T pareado) para o grupo refrigerado ($33,8 \pm 9,5$) do que para o grupo transportado à temperatura ambiente ($25,0 \pm 12,2$).

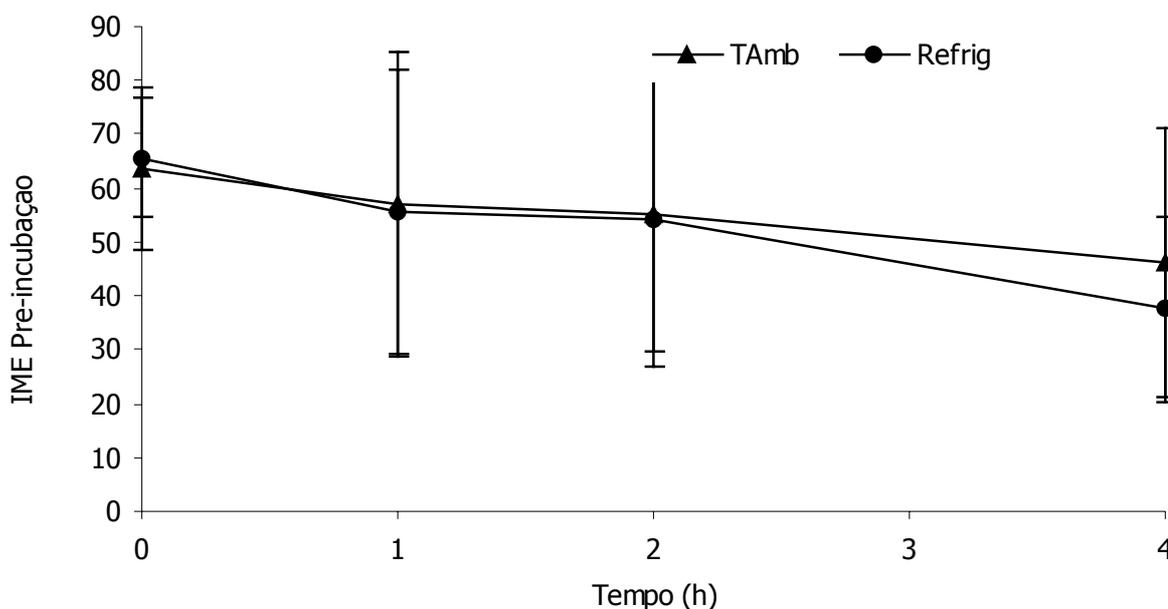


Figura 5.2.3 - Variação dos valores médios (\pm DP) do índice de motilidade espermática, em função do tempo de pré-incubação, para as amostras transportadas à temperatura ambiente (**T Amb**) ou sob refrigeração (**Refrig**) ($n = 5$ animais / 7 ejaculados). Jundiaí / São Paulo, 2002

Ao comparar um meio de cultivo para a capacitação do sêmen canino (CCM) a um meio livre de BSA e bicarbonato (Tris – Frutose – Citrato; TCM), substâncias consideradas importantes para a capacitação *In vitro*, Rota et al. (1999) verificaram uma queda na motilidade do sêmen canino refrigerado ao longo do tempo; queda essa que foi mais acentuada para o grupo mantido no meio de capacitação. Nesse mesmo estudo, porém, os autores não verificaram diferença entre esses dois meios de cultivo na manutenção da longevidade dos espermatozóides não refrigerados. Associando esses achados ao acompanhamento do padrão de hiperativação (por meio do sistema CASA) e de marcação pela Clortetraciclina (CTC) fluorescente; Rota et al. (1999) sugerem que a refrigeração pode ter reduzido a longevidade dos espermatozóides por ter causado alterações semelhantes à capacitação. Da mesma forma, no presente experimento, a refrigeração levou a uma queda precoce do índice de motilidade espermática, possibilitando a interpretação de que a refrigeração antecipou do término da capacitação, a qual sabidamente reduz intervalo durante o qual os espermatozóides se apresentam viáveis (WATSON, 1995; HARRISON, 1996).

Por meio das análises de variância dos dados obtidos após o período de incubação, verificamos que não foi possível observar efeito de interação entre as variáveis classificatórias: *Transporte* (temperatura ambiente ou refrigerado), *Tempo* (0, 1, 2 ou 4 h) e *Ca²⁺ Ion* (presente ou ausente durante incubação) sobre as variáveis resposta *Integridade Acrossomal* e *Índice de Motilidade Espermática* (**Tabela 5.2.2**). Ainda nessa tabela, observamos que ao serem analisados os efeitos de cada um desses tratamentos separadamente, o tempo e o transporte apresentaram efeito estatisticamente significativo sobre a integridade dos acrossomos.

O efeito do método de transporte sobre as variáveis resposta, avaliadas após o período de incubação, pode ser observado na **Tabela 5.2.3**. Nessa tabela, pode-se notar que as amostras refrigeradas apresentaram, em média, uma proporção significativamente menor ($P=0,0047$) de acrossomos íntegros (53,98%), quando comparadas àquelas transportadas à temperatura ambiente (63,85%), mantendo a resposta observada imediatamente após o transporte e reaquecimento dessas amostras.

Tabela 5.2.2 - Análise de variância ("SAS for Windows") do efeito dos tratamentos e suas interações sobre o Índice de Motilidade Espermática e Integridade Acrossomal dos espermatozóides de jaguatirica. Jundiá / São Paulo, 2002

Tratamentos e Interações	Graus de liberdade	Valor de p	
		IME	IA
Ca ²⁺ Ion (presente ou ausente durante incubação)	1	0,3359	0,6667
Tempo de pré-incubação (0,1, 2 ou 4 h)	3	0,0004	0,0008
Transporte (temperatura ambiente ou refrigerado)	1	0,8468	0,0031
Ca ²⁺ Ion x Transporte ¹	1	0,5492	0,5216
Ca ²⁺ Ion x Tempo ¹	3	0,9651	0,9849
Transporte ¹ x Tempo ¹	3	0,9480	0,8174
Ca ²⁺ Ion x Transporte ¹ x Tempo ¹	3	0,9693	0,9213
Número Total de Amostras (n) = 96	95	-----	-----

Tabela 5.2.3 - Efeito do método de transporte sobre os valores (médias ± DP) da Integridade Acrossomal e do Índice de Motilidade Espermática dos espermatozóides de jaguatirica após incubação. Jundiá / São Paulo, 2002

	Temperatura ambiente	Refrigerado
Integridade acrossomal (%)	63,85 ^a ±14,99	53,98 ^b ±18,74
Índice de motilidade espermática	35,90 ^a ±19,85	35,16 ^a ±22,69

^{a,b}Letras sobresscritas diferentes, em uma mesma linha, indicam resultados significativamente diferentes (p<0,05, ANOVA, SAS for Windows).

A **Tabela 5.2.4** indica os valores médios da integridade acrossomal e do índice de motilidade espermática, para cada intervalo de tempo de pré-incubação. As amostras incubadas por 4 horas apresentaram uma proporção média de espermatozóides com acrossomos intactos e um índice de motilidade espermática médio significativamente menores do que todos os demais intervalos, que não diferiram entre si.

Não foi possível observar efeito estatisticamente significativo devido à presença do cálcio ionóforo durante o período de incubação, sobre a Integridade Acrossomal ou sobre o Índice de Motilidade Espermática, como se pode verificar pela **Tabela 5.2.5**.

Tabela 5.2.4 - Efeito do tempo de pré-incubação sobre os valores (médias \pm DP) da Integridade Acrossomal e do Índice de Motilidade Espermática dos espermatozóides de jaguatirica após incubação. Jundiaí / São Paulo, 2002

	0h	1h	2h	4h
Integridade acrossomal (%)	64,50 ^a ±17,52	63,09 ^a ±14,79	59,12 ^a ±17,19	44,79 ^b ±15,15
Índice de motilidade espermática	43,21 ^a ±21,99	39,20 ^a ±21,95	37,20 ^a ±18,97	17,70 ^b ±9,52

^{a,b}Letras sobrescritas diferentes, em uma mesma linha, indicam resultados significativamente diferentes ($p < 0,05$, ANOVA, SAS for Windows).

Tabela 5.2.5 - Efeito da presença do cálcio ionóforo A23187 durante incubação sobre os valores (médias \pm DP) da Integridade Acrossomal e do Índice de Motilidade Espermática dos espermatozóides de jaguatirica. Jundiaí / São Paulo, 2002

	Sem cálcio	Com cálcio
Integridade acrossomal (%)	59,44 ^a ±17,26	58,29 ^a ±18,17
Índice de motilidade espermática	37,47 ^a ±22,07	33,54 ^a ±20,36

^{a,b}Letras sobrescritas diferentes, em uma mesma linha, indicam resultados significativamente diferentes ($p < 0,05$, ANOVA, SAS for Windows).

A queda significativa do Índice de Motilidade Espermática e da Integridade Acrossomal após os períodos de pré-incubação e a subsequente exposição ao Ca^{2+} Ion era esperada devido ao envelhecimento natural das células espermáticas ao longo do tempo de pré-incubação. No entanto, a velocidade de diminuição da integridade estrutural e funcional das células espermáticas parece ter se intensificado após 2 horas de pré incubação, já que o intervalo de 4 horas foi o único significativamente menor, em relação às duas variáveis, quando comparado aos demais intervalos, que não diferiram entre si.

O valor da Integridade Acrossomal das amostras refrigeradas manteve-se significativamente menor que o valor da mesma variável das amostras transportadas à temperatura ambiente, o que demonstra que os efeitos deletérios da refrigeração sobre a integridade das membranas dos espermatozóides refletiu-se sobre todo o período de pré-incubação e incubação.

Ao avaliar o efeito do cálcio ionóforo sobre a integridade acrossomal, separando-se as amostras transportadas à temperatura ambiente das refrigeradas, desconsiderando-se o fator tempo de pré-incubação, pode-se afirmar que o resfriamento foi responsável por estimular a capacitação espermática no sêmen da jaguatirica. Essa observação deve-se ao fato de que, entre as amostras mantidas à temperatura ambiente, não foi observada diferença significativa ($p > 0,01$; teste T pareado) entre o grupo incubado com cálcio ionóforo e o grupo controle, enquanto para as amostras refrigeradas essa diferença foi bastante significativa ($p < 0,01$) (**Figura 5.2.4**). Tal constatação de que o resfriamento, de alguma forma, estimulou o término da capacitação espermática, está de acordo com as conclusões de Watson (1995) e de Bailey, Bilodeau e Cormier (2000).

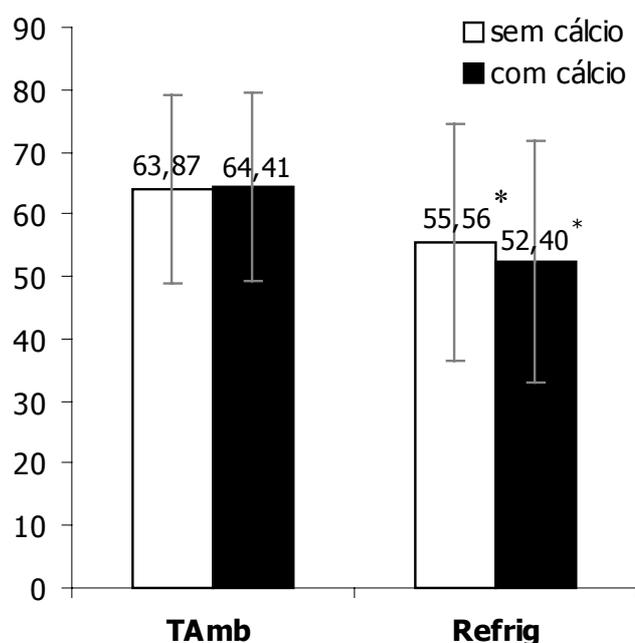


Figura 5.2.4 - Efeito do cálcio ionóforo sobre a proporção média (%) de acrossomos intactos em função do método de transporte, independente do tempo. *Resultados significativamente diferentes ($p = 0,0062$; teste T pareado). Jundiá / São Paulo, 2002

Os dados acima são bastante importantes para elucidar como os eventos estudados durante a manipulação do sêmen influenciaram alguns aspectos da fisiologia espermática *In vitro* da jaguatirica. Segundo Yanagimachi (1994), o tempo de pré-incubação é uma variável que apresenta grande influência sobre a capacitação *In vitro* dos espermatozoides mamíferos. Mais recentemente, Bailey,

Bilodeau e Cormier (2000) apontaram o resfriamento como um fator de significativa importância na indução da capacitação espermática nas espécies domésticas.

De acordo com esses postulados teóricos, hipotetizou-se que no presente experimento com o passar do tempo de pré-incubação seria observado um efeito progressivamente mais acentuado do cálcio ionóforo sobre a redução da integridade acrossomal, até um pico de capacitação na população espermática; esperando-se ainda que esse pico fosse antecipado nas amostras previamente refrigeradas. Porém, por meio das análises de variância, não foi possível observar interação ($p > 0,05$) entre o efeito do método de transporte e/ou do tempo de pré-incubação sobre o efeito da presença do cálcio ionóforo durante a incubação. Portanto, se o teste de capacitação espermática através da reação acrossômica induzida pelo cálcio ionóforo for avaliado sumariamente por esse método estatístico, podemos entender que, no presente experimento, tal teste de função espermática não foi capaz de detectar quaisquer influências da refrigeração ou do tempo de pré-incubação sobre a capacitação dos espermatozoides.

No entanto, ao se aplicar o supracitado teste de avaliação da capacitação espermática, deve-se sempre comparar cada amostra incubada na presença do cálcio ionóforo ao respectivo par incubado na ausência dessa substância (controle) (DE JONGE; MACK; ZANEVELD, 1989; LONG et al., 1996). Dessa forma, pode-se determinar se aquela dada amostra foi capaz de responder ao desafio com o cálcio ionóforo, o que representa a conclusão da capacitação espermática por uma fração significativa da população de espermatozoides.

Para isso, os dados foram subdivididos em oito grupos experimentais, separados pelos tratamentos empregados antes do período de incubação, e analisados quanto à influência do cálcio ionóforo sobre a Integridade Acrossomal e sobre o Índice de Motilidade Espermática em cada um desses grupos; por meio do teste t para amostras pareadas, como pode ser observado pela **Tabela 5.2.6**. Esses mesmos resultados podem também ser apreciados na **Figura 5.2.5**.

Tabela 5.2.6 - Efeito da exposição ao Ca^{2+}Ion sobre o Índice de Motilidade Espermática e sobre a Integridade Acrossomal (médias \pm DP) para cada um dos tratamentos empregados antes da incubação. Jundiaí / São Paulo, 2002

Método de Transporte	Tempo de Pré-incubação (h)	IME		IA (%)	
		Controle ⁽¹⁾	Ca^{2+}Ion ⁽²⁾	Controle ⁽¹⁾	Ca^{2+}Ion ⁽²⁾
Temperatura Ambiente	0	42,1 \pm 21,4	41,4 \pm 16,0	69,3 \pm 13,2	69,6 \pm 13,3
	1	39,3 \pm 25,1	42,1 \pm 17,3	67,1 \pm 13,1	69,5 \pm 12,7
	2	41,8 \pm 24,9	35,0 \pm 17,0	60,8 \pm 14,6	63,6 \pm 13,1
	4	18,6 \pm 8,5	17,1 \pm 7,5	48,5 \pm 10,6	44,8 \pm 11,1
Refrigerado	0	46,4 \pm 26,6	42,9 \pm 27,2	57,2 \pm 20,4	53,0 \pm 23,5
	1	42,1 \pm 22,0	33,2 \pm 26,4	54,3 \pm 17,7	53,4 \pm 17,4
	2	40,0 \pm 20,0*	31,3 \pm 16,6*	51,1 \pm 23,4*	45,4 \pm 23,1*
	4	20,0 \pm 11,2	15,1 \pm 12,7	44,3 \pm 21,6	41,6 \pm 19,0

⁽¹⁾ Amostras as incubadas na ausência (controle) ou ⁽²⁾ na presença do Ca^{2+}Ion . * Valores significativamente diferentes entre si ($p < 0,05$; teste T pareado), para a mesma variável.

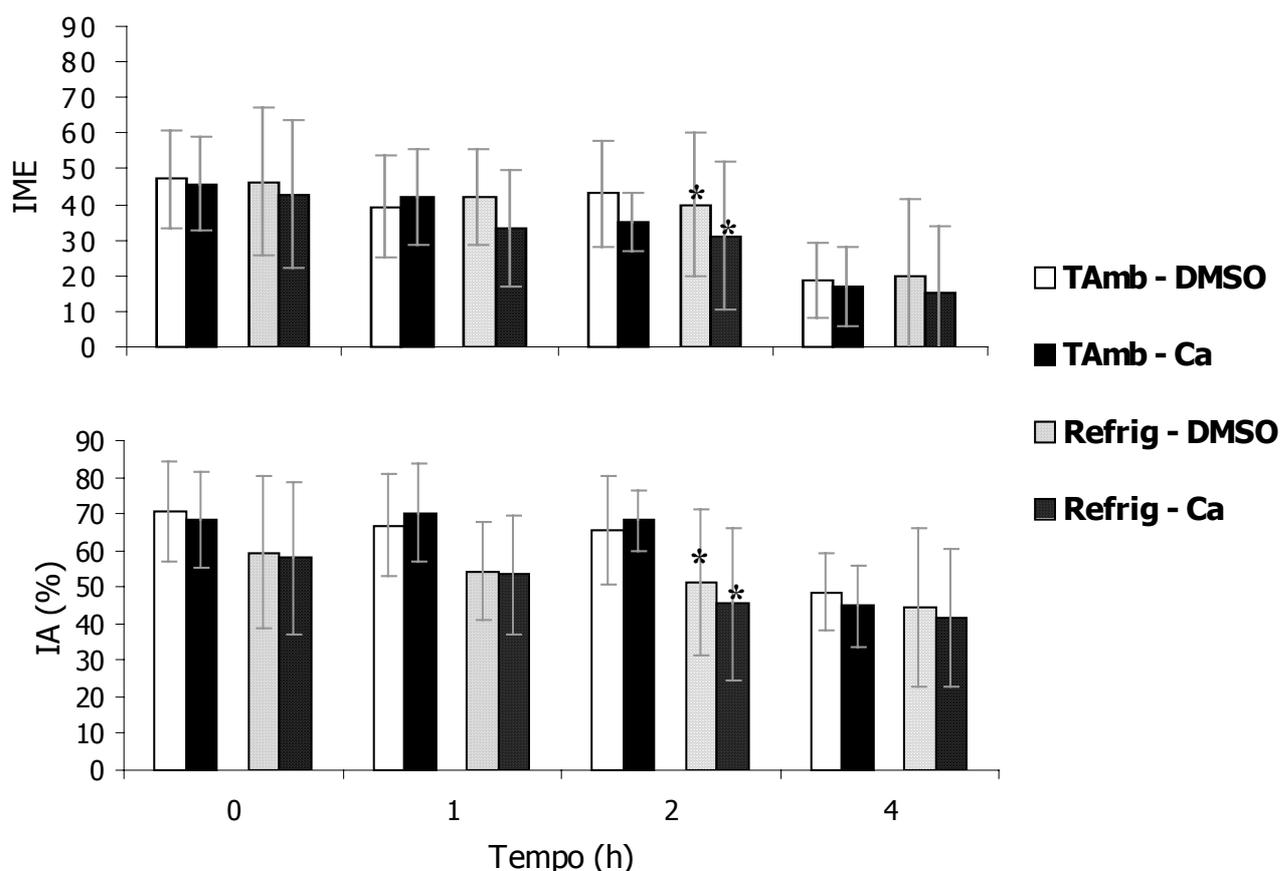


Figura 5.2.5 - Variação ao longo do tempo de pré-incubação do Índice de Motilidade Espermática e da Integridade Acrossomal do sêmen da jaguatirica (médias \pm DP), avaliado após a incubação na ausência (*DMSO*) ou na presença (*Ca*) do Ca^{2+}Ion , para as amostras transportadas à temperatura ambiente (*T_{Amb}*) ou sob refrigeração (*Refrig*). * Valores significativamente diferentes entre si ($p < 0,05$; teste T pareado), para a mesma variável. Jundiaí / São Paulo, 2002

Tais análises revelaram que o único grupo onde foi possível verificar uma proporção significativa de espermatozoides que completaram a capacitação espermática foi aquele transportado sob refrigeração e pré-incubado por 2 horas, pois esse foi o único grupo em que a proporção de espermatozoides apresentando acrossomos intactos foi significativamente ($p = 0,037$) menor para as amostras incubadas na presença do Ca^{2+} Ion. Esses resultados não significam que o fenômeno da capacitação espermática não tenha ocorrido entre amostras submetidas aos demais tratamentos antes da incubação, mas possivelmente indica que a refrigeração seguida pela pré-incubação por duas horas induziu a capacitação de forma mais intensa em comparação aos demais tratamentos.

Por outro lado, a constatação de que o grupo transportado à temperatura ambiente e pré-incubado por duas horas foi também o único após o qual verificou-se uma redução significativa do Índice de Motilidade Espermática devida à exposição Ca^{2+} Ion, indica que a redução da taxa de acrossomos intactos pode ter sido devida a morte e degeneração celular e não necessariamente à capacitação espermática. No entanto, o primeiro estudo em que o ensaio de reação acrossômica induzida pelo Ca^{2+} Ion foi utilizado para a avaliação da capacitação espermática na família *Felidae* (LONG et al., 1996), constatou também que todas as amostras em que o Ca^{2+} Ion promoveu uma redução significativa da Integridade Acrossomal do sêmen de gatos domésticos, houve também uma queda marcada da proporção de espermatozoides móveis, indicando também uma possível redução da viabilidade espermática devida ao Ca^{2+} Ion. Independentemente desse conflito metodológico os autores chegaram a uma série de conclusões quanto à dinâmica da capacitação espermática no gato doméstico, baseando seus achados nos resultados do ensaio de reação acrossômica induzida pelo Ca^{2+} Ion.

Dentre espermatozoides incubados por quatro horas foi observada uma menor proporção ($p < 0,05$) de acrossomos intactos e um valor significativamente mais baixo ($p < 0,05$) para o índice de motilidade espermática, frente aos demais intervalos de pré-incubação. Tais observações sugerem que esse tempo de incubação, nas condições do presente experimento, pode ter sido responsável por danos severos tanto à estrutura quanto à função dos espermatozoides. Tais danos podem explicar

porque o fenômeno da capacitação não foi observado nos espermatozóides pré-incubados por quatro horas, apesar de tê-lo sido no tempo 2 horas.

Conforme foi discutido anteriormente, a distinção entre a reação acrossômica verdadeira e morte e degeneração acrossomal é um aspecto bastante delicado no estudo da fisiologia espermática, tendo sido conseguido através do uso de fluorocromos e corantes mistos. No entanto, segundo Harrison e Vickers (1990), os métodos de avaliação simultânea de viabilidade espermática e integridade acrossomal consistem geralmente de técnicas indiretas, envolvendo esfregaços secos ao ar, que apresentam possibilidades inerentes de dano artefactual.

Métodos diretos para esse tipo de avaliação simultânea em suspensão aquosa, sem fixação das células (HARRISON; VICKERS, 1990) se depararam com o transtorno de que, após a reação acrossômica, o espermatozóide apresenta uma dramática redução do tempo em que continua viável, uma vez fisiologicamente esse fenômeno ocorre quando os espermatozóides estão bastante próximos ao sítio de fertilização (YANAGIMACHI, 1994). Com isso, muitos dos espermatozóides classificados como degenerados por esses métodos, podem ter morrido após terem completado a capacitação espermática e a reação acrossômica.

Além disso, o processo de capacitação espermática em si, envolve um aumento da fluidez da membrana plasmática dos espermatozóides, que está associado a uma desestabilização dessa membrana e a um aumento da taxa de morte da celular, característica essa que dificulta a verificação da capacitação espermática pela resposta a estimulantes específicos da reação acrossômica (HARRISON, 1996). No entanto, em seres humanos e bovinos (RODRIGUEZ - MARTINEZ, et al., 1997) os resultados do ensaio de reação acrossômica induzida pelo Ca^{2+} Ion tem demonstrado altas correlações com a fertilidade *In vitro* e *In vivo*.

Entre as conclusões do estudo de Long et al. (1996), a observação de que espermatozóides de gatos domésticos normospermicos necessitam ao menos duas horas de pré-incubação *In vitro* para se tornarem capacitados coincide com o tempo necessário para que fosse observada redução significativa da integridade acrossomal devida à exposição ao Ca^{2+} Ion, entre as amostras refrigeradas. No entanto, para a aplicação bem sucedida de técnicas de fecundação *In vitro* na jaguatirica, futuros

estudos são necessários para determinar as condições, avaliadas imediatamente após a colheita, necessárias para a capacitação dos espermatozóides dessa espécie.

Porém, exceto pela refrigeração, as condições de transporte testadas foram bastante desfavoráveis para a indução da capacitação, já que o meio PDV não possui bicarbonato de sódio nem albumina sérica bovina, substâncias sabidamente importantes para a capacitação espermática *In vitro*. De fato, entre as amostras transportadas à temperatura ambiente, o fenômeno da reação acrossômica espontânea certamente não ocorreu de forma significativa já que a proporção de acrossomos intactos não foi afetada por esse método de transporte. Por essa razão, é possível supor que estudos futuros investigando os requerimentos para a capacitação do sêmen da jaguatirica venham a constatar que os espermatozóides dessa espécie necessitam duas horas ou mais de pré-incubação para que o fenômeno de capacitação espermática seja verificado. No entanto, possivelmente o fato de não ter sido observada capacitação espermática entre as amostras mantidas à temperatura ambiente não se deve apenas aos tempos de pré-incubação avaliados, mas provavelmente a condições insatisfatórias de incubação durante o ensaio de reação acrossômica induzida pelo Ca^{2+} Ion.

Nesse sentido, verificou-se no presente experimento que as condições de incubação do grupo controle, exposto apenas ao DMSO, levaram a uma redução bastante significativa ($p < 0,000001$, teste T pareado) do Índice de Motilidade Espermática avaliado antes do período de incubação ($54,7 \pm 22,2$) em comparação ao mesmo parâmetro avaliado após a incubação ($38,2 \pm 23,1$), quando consideradas as médias (\pm DP) de todos os dados analisados em conjunto. No entanto, após a análise dos valores referentes a cada um dos oito tratamentos empregado antes da incubação em separado (**Figura 5.2.6**), verificou-se que os únicos dois grupos em que a incubação não promoveu redução significativa do Índice de Motilidade Espermática ($p > 0,05$; teste T pareado) foram aqueles pré-incubados por duas horas, para ambas as amostras refrigeradas ou transportadas à temperatura ambiente. É bastante difícil interpretar esse resultado, porém, esse efeito menos acentuado das condições de incubação após duas horas de pré-incubação, possivelmente, propiciou que um maior número de células viáveis respondesse ao

estímulo do Ca^{2+} Ion, permitindo a observação de um efeito significativo dessa substância sobre a integridade acrossomal.

Essas observações nos permitem afirmar que as condições de incubação foram bastante desfavoráveis a integridade funcional dos espermatozoides e provavelmente, por essa razão, a avaliação da capacitação por meio da reação acrossômica induzida pelo cálcio ionóforo tenha sido comprometida. No entanto, as observações provenientes desse ensaio, como a capacitação significativa do grupo pré-incubado por duas horas após transporte sob refrigeração, não são invalidadas por essa condição deletéria à motilidade, já que essas observações basearam-se em metodologia científica rigorosa, tendo procurado-se realizar todos os controles experimentais possíveis nas condições testadas.

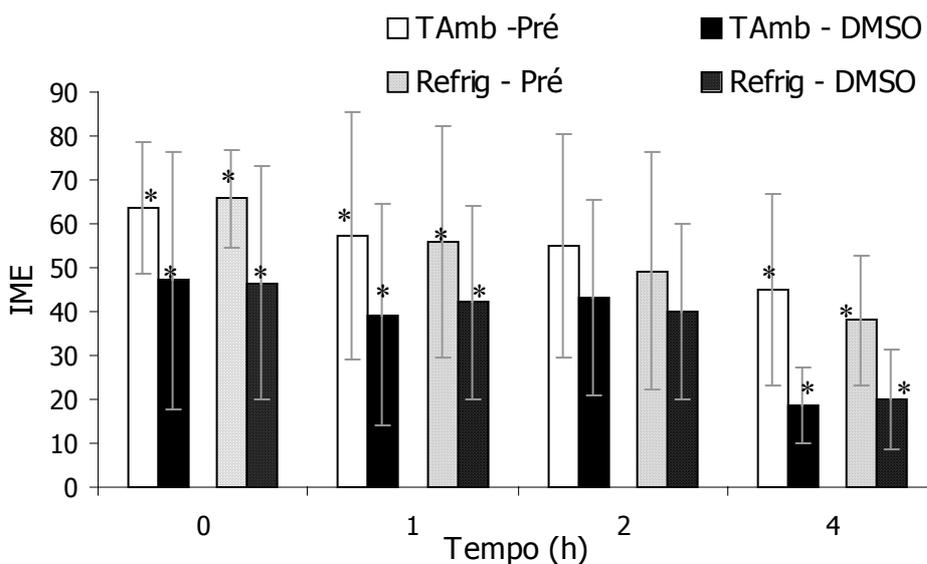


Figura 5.2.6 - Variação ao longo do tempo de pré-incubação do Índice de Motilidade Espermática (médias \pm DP) do sêmen da jaguatirica, avaliado antes (*Pré*) e após a incubação na presença de DMSO apenas (*DMSO*), das amostras transportadas à temperatura ambiente (*T Amb*) ou sob refrigeração (*Refrig*). * Valores antes e depois da incubação significativamente diferentes ($p < 0,05$; teste T pareado). Jundiá / São Paulo, 2002

No segundo experimento desse estudo, as condições de incubação, em especial o efeito de diferentes concentrações de Ca^{2+} Ion, são estudadas em maior profundidade. Possivelmente, a compreensão das deficiências na metodologia adotada e a melhoria das condições de incubação para o ensaio da reação

acrossômica induzida pelo Ca^{2+} Ion em estudos futuros, poderá permitir a análise da proporção de espermatozoides apresentando reação acrossômica verdadeira, como um índice de capacitação da população espermática, permitindo a comparação direta dos grupos experimentais na avaliação das condições para indução da capacitação espermática *In vitro* na jaguatirica.

Do ponto de vista do interesse prático dos resultados deste experimento, todas as observações empíricas e teóricas discutidas acima indicam que nas situações em que haja interesse em reproduzir jaguatiricas alojadas em zoológicos ou criatórios relativamente próximos, por meio de reprodução assistida, é mais vantajoso manter o sêmen à temperatura ambiente do que refrigerá-lo. Esse tipo de situação, onde jaguatiricas se encontram alojadas em locais distintos, porém relativamente próximos, a distâncias que podem ser percorridas entre duas e três horas, ocorre freqüentemente dentro do estado de São Paulo, sendo que muitos dos animais cativos são agressivos, não aceitando a presença de outro indivíduo em seu recinto (ADANIA, 2002). Swanson et al. (1996) demonstraram que é possível obter gestação a termo e parto de um filhote de jaguatirica saudável, por meio da técnica de inseminação artificial, destacando a importância dessa técnica quando se deseja manter intercâmbio genético dentro de uma população de jaguatiricas cativas, sem que haja necessidade de retirada de indivíduos da vida selvagem.

Apesar de termos demonstrado que é possível verificar o fenômeno da capacitação espermática *In vitro* entre os espermatozoides refrigerados, mesmo no caso de fecundação *In vitro*, é mais interessante poupar os espermatozoides dos efeitos deletérios do resfriamento, mantendo-os à temperatura ambiente e evitando variações bruscas na mesma. Isso ocorre pois, quanto maior for o número de espermatozoides viáveis no momento do início da co-incubação com os oócitos, maiores serão as chances de fecundação.

Vários estudos têm demonstrado que é possível obter fecundação *In vitro* com sucesso entre diversas espécies de felídeos (HOWARD; BUSH; WILDT, 1991; DONOGHUE et al., 1990; MILLER et al., 1990; MORATO et al., 2002), sem necessidade de incubação do sêmen antes da co-incubação com oócitos maduros. No gato doméstico, já foi demonstrado que é possível verificar penetração em intervalos

de tempo tão reduzidos como 20 minutos após o início da co-incubação dos gametas (NIWA; OHARA; IRITANI, 1985).

Todavia, nas situações em que haja interesse em congelar o sêmen de determinada jaguatirica que se encontre em um estabelecimento que não possua os equipamentos necessário para tal procedimento, ou mesmo em situações onde animais selvagens sejam capturados, a refrigeração por meio do Equitainer Modificado, passa a ser uma alternativa bastante interessante. Tendo em vista que a taxa de resfriamento desse sistema, como foi discutido anteriormente, está próxima aos valores considerados ideais para carnívoros domésticos, tal técnica poderá diminuir os efeitos deletérios associados ao resfriamento que precede a congelação propriamente dita, pelas técnicas em uso corrente (PUKAZHENTHI et al., 1999). É importante observar que a o transporte do sêmen sob refrigeração no presente estudo envolveu a lavagem do sêmen após o transporte. Procedimentos que objetivem a congelação do sêmen de jaguatiricas se valendo desse sistema de refrigeração, deverão incluir a lavagem apenas após o descongelamento, evitando o reaquecimento desnecessário do sêmen. Porém, como foi discutido anteriormente, a lavagem não pode ser negligenciada, uma vez que as técnicas de inseminação artificial de felídeos envolvem deposição intrauterina do sêmen e a omissão da lavagem pode aumentar substancialmente o risco de endometrite e transmissão de moléstias infecciosas (HOWARD, 1999).

5.3 EXPERIMENTO 2: Avaliação do efeito da concentração de cálcio ionóforo A23187 na indução da reação acrossômica

Como pode-se observar pela **Tabela 5.3.1**, o tratamento empregado durante a incubação exerceu um efeito bastante significativo sobre o índice de motilidade espermática, que foi independente do tempo de pré-incubação, não tendo exercido efeito sobre a integridade acrossomal para os dados analisados como um todo. Tais efeitos podem ser visualizados pela **Figura 5.3.1**.

Tabela 5.3.1 - Análises de variância do efeito do tempo de pré-incubação, dos tratamentos durante a incubação e da interação desses fatores sobre integridade acrossomal e sobre o índice de motilidade espermática. Jundiaí / São Paulo, 2002/2003

Fonte de variação	Graus de liberdade	Significância do efeito (Valor de p)	
		IA	IME
Tratamento (durante incubação)	3	0,2887	0,0025
Tempo (de pré-incubação)	2	0,2649	0,1745
Tempo x Tratamento	6	0,9998	0,9916
Número Total de Amostras (n) = 36	35	-	-

Ao se comparar as amostras controle e as tratadas pelo Ca^{2+}Ion para cada intervalo de pré-incubação, por meio do teste t pareado, nenhuma das diferenças observadas para ambas as concentrações testadas foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Porém, ao se analisar o efeito dos tratamentos com o Ca^{2+}Ion , agrupando os três intervalos de pré-incubação (**Tabela 5.3.2**), verificou-se que as amostras tratadas com 1 ou 2 μM dessa substância, sofreram uma redução significativa ($p < 0,05$; teste t pareado) do índice de motilidade espermática em comparação aos grupos tratados apenas com DMSO; já para a integridade acrossomal, foi possível demonstrar essa diferença apenas para o grupo tratado com 2 μM de Ca^{2+}Ion .

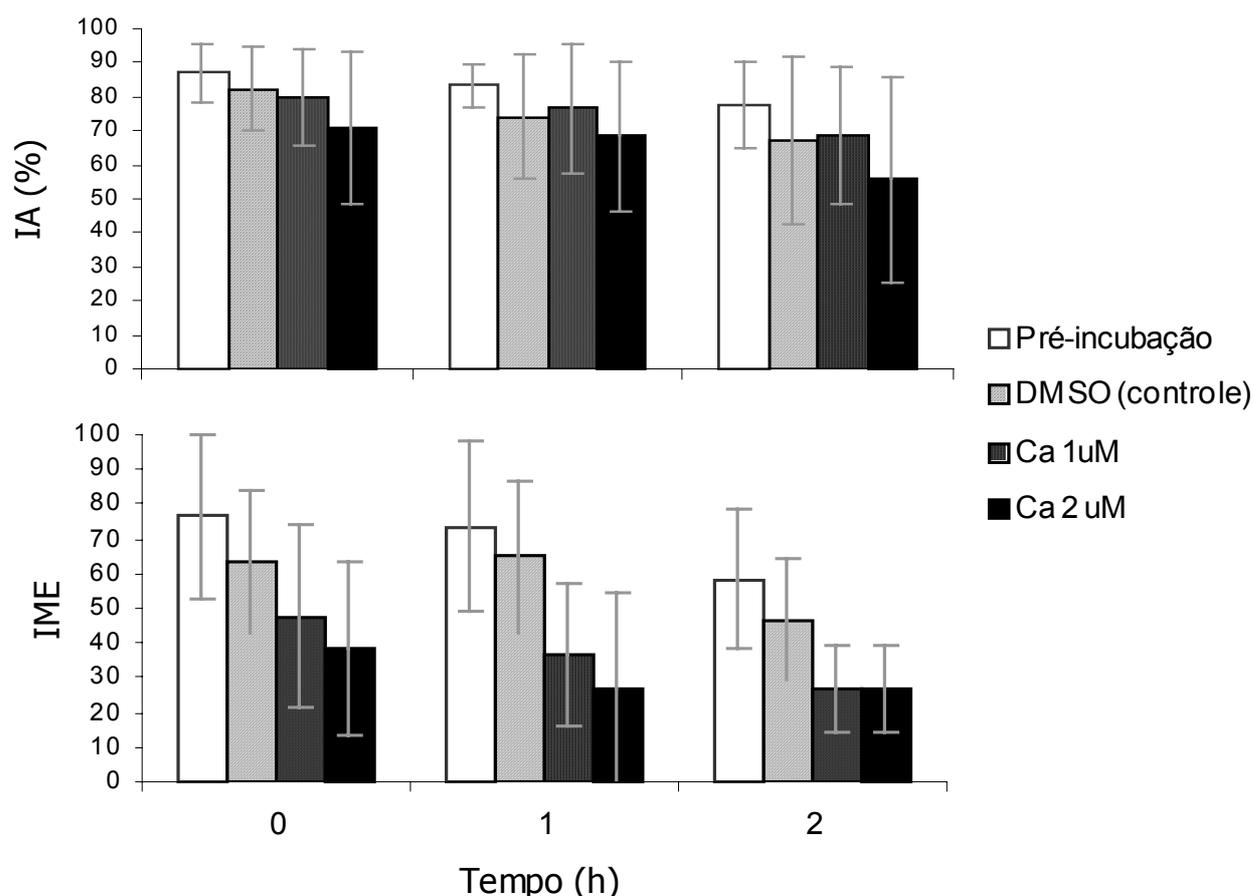


Figura 5.3.1. Efeito do tempo de pré-incubação e dos tratamentos durante a incubação sobre os valores (médias \pm DP) da integridade acrossomal e do índice de motilidade espermática do sêmen da jaguatirica. Pre - valores antes da incubação; DMSO - valores apos incubação com DMSO (controle); Ca1 - valores apos incubação com 1 μ M de Ca^{2+} Ion; Ca2 - valores apos incubação com 2 μ M de Ca^{2+} Ion. Jundiá / São Paulo, 2002/2003

Tabela 5.3.2 - Efeito dos tratamentos durante a incubação do sêmen da jaguatirica, independentemente do tempo de pré-incubação, sobre os valores (médias \pm DP) da integridade acrossomal e do índice de motilidade espermática. Jundiá / São Paulo, 2002/2003

Treatmento durante incubação	IA	IME
Pré-incubação	82,68 \pm 9,16 ^a	69,44 \pm 21,57 ^a
DMSO	74,52 \pm 17,94 ^b	58,33 \pm 19,53 ^b
Ca 1 μ M	75,09 \pm 16,44 ^b	36,94 \pm 19,91 ^c
Ca 2 μ M	64,99 \pm 22,94 ^c	30,56 \pm 20,53 ^d

^{a, b, c, d} Letras sobrescritas diferentes na mesma coluna indicam resultados estatisticamente diferentes ($p < 0,05$; teste t pareado, Excel® for Windows).

O fato de não ter sido observado efeito significativo do Ca^{2+}Ion , tanto sobre o índice de motilidade espermática como sobre a integridade acrossomal, ao se analisar os tempos separadamente, deveu-se possivelmente ao número reduzido de amostras ($n=3$) para cada um dos tratamentos assim analisados. Porém, ao se analisar os tempos em conjunto o número amostral para cada tratamento tornou-se mais elevado ($n=9$), permitindo que fosse verificado efeito negativo do Ca^{2+}Ion sobre a motilidade espermática para ambas as concentrações testadas, enquanto a proporção de acrossomos intactos foi reduzido apenas pelo tratamento com essa substância à concentração de $2\ \mu\text{M}$.

Com base nesses resultados, é também delicado afirmar que neste experimento foi verificado o fenômeno de capacitação espermática por meio do ensaio de reação acrossômica induzida pelo Ca^{2+}Ion , assim como no primeiro experimento; pois, ainda que tenha sido observada uma proporção significativamente menor de acrossomos íntegros entre as amostras tratadas com Ca^{2+}Ion à concentração de $2\ \mu\text{M}$, tal redução pode ter sido devida à morte dos espermatozóides e degeneração acrossomal, já que a motilidade espermática das mesmas amostras foi em média significativamente menor em comparação ao grupo controle, tratado apenas com DMSO.

Ainda assim, a observação de que à concentração de $2\ \mu\text{M}$, o Ca^{2+}Ion foi capaz de reduzir a proporção de acrossomos intactos, enquanto $1\ \mu\text{M}$ dessa substância não interferiu na mesma variável, indica que estudos futuros deverão investigar concentrações de Ca^{2+}Ion superiores a $1\ \mu\text{M}$ para a indução da reação acrossômica de espermatozóides de jaguatiricas, procurando identificar as causas da redução acentuada da motilidade espermática promovida pela incubação junto a essa substância. Nesse sentido, De Jonge, Mack e Zaneveld (1989) verificaram que a concentração de $5\ \mu\text{M}$ do Ca^{2+}Ion produziu resultados muito menos consistentes na indução da reação acrossômica de espermatozóides humanos do que as concentrações de 10 ou $30\ \mu\text{M}$ dessa substância.

Vale salientar que as concentrações de Ca^{2+}Ion comparadas no presente estudo basearam-se em resultados preliminares do estudo de Swanson e Wildt (1998) que verificaram perda significativa da motilidade espermática ao utilizar a concentração de $10\ \mu\text{M}$ para indução da reação acrossômica de espermatozóides de diferentes

espécies de felídeos, incluindo a jaguatirica. Esses resultados divergem dos obtidos por De Jonge, Mack e Zaneveld (1989), possivelmente devido ao fato de que neste último trabalho a comparação foi feita entre o grupo incubado na presença de Ca^{2+} Ion e outro incubado nas mesmas condições, exceto pela ausência dessa substância. Já no estudo de Swanson e Wildt (1998) foram comparadas as diferenças entre os valores observados antes e depois da incubação, não tendo sido avaliado o efeito da incubação sobre um grupo controle, sem Ca^{2+} Ion. Assim é lógico imaginar que o efeito da incubação como um todo é mais deletério à viabilidade dos espermatozoides do que o efeito do Ca^{2+} Ion, quando medido isoladamente como no trabalho de De Jonge, Mack e Zaneveld (1989) e no presente trabalho.

Long et al. (1996), estudando a capacitação espermática em gatos domésticos, basearam-se na mesma metodologia de estudo utilizada por De Jonge, Mack e Zaneveld (1989), porém utilizaram uma concentração de Ca^{2+} Ion ($4\mu\text{M}$) intermediária às utilizadas nesse ($10\mu\text{M}$) e no presente estudo (1 e $2\mu\text{M}$); verificando perda significativa da motilidade espermática associada ao período de incubação, tal como no presente estudo.

Outro achado importante, que pode ser observado na **Tabela 5.3.2**, foi a constatação de que as amostras incubadas na presença apenas do DMSO sofreram redução significativa ($p < 0,05$) tanto no índice de motilidade espermática quanto na integridade acrossomal, em relação às amostras avaliadas antes da incubação. Tal observação indica que as condições do ensaio de indução da reação acrossômica foram desfavoráveis para a investigação do fenômeno de capacitação espermática pois, independentemente do efeito do Ca^{2+} Ion, a incubação provavelmente levou a perda da integridade das membranas lipoprotéicas dos espermatozoides, refletidas pela diminuição da motilidade espermática e degeneração das membranas acrossomais.

Dentre as causas dessa redução da viabilidade espermática podem ser incluídos: a sensibilidade das células espermáticas ao tratamento com DMSO, a inadequação do sistema de incubação e o tempo excessivo de incubação.

Em relação à primeira hipótese, ao investigarem a ação de inibidores da fosforilação dos resíduos de tirosina sobre a reação acrossômica induzida pelo Ca^{2+} Ion em espermatozoides de gatos domésticos, Pukazhenti et al. (1998)

realizaram esse ensaio tal como descrito no estudo de Long et al. (1996), exceto pela concentração de DMSO utilizada, que foi mais baixa (0,04%) em comparação ao presente experimento (0,05%) e em comparação ao experimento de Long et al. (1996) (0,1%) não sendo então verificada uma redução da viabilidade espermática associada à redução da integridade acrossomal após a exposição ao Ca^{2+} Ion. Tal como no estudo de Long et al. (1996), Pukazhenthil et al. (1998) utilizaram uma concentração mais elevada de Ca^{2+} Ion (4 μM) comparada à utilizada no presente experimento, verificando redução significativa da integridade acrossomal por essa substância a essa concentração, sem comprometimento significativo da motilidade espermática, o que pode ser interpretado como a conclusão da capacitação por uma fração significativa da população espermática.

Estudos envolvendo transmissão de impulsos neuronais demonstraram que o DMSO pode produzir um bloqueio despolarizante de canais de potássio, sejam eles sensitivos ou não à tensão elétrica (EVANS; REID; SHARP, 1993). O processo fisiológico de capacitação, por sua vez, envolve a hiperpolarização da membrana plasmática dos espermatozoides, pela diminuição da modulação inibitória dos canais de potássio, que por sua vez regulam a habilidade dos espermatozoides em gerar elevações transitórias dos níveis de cálcio intracelulares (VISCONTI et al., 2002). Podemos então hipotetizar que o DMSO poderia agir despolarizando a membrana plasmática dos espermatozoides, impedindo a hiperpolarização associada a capacitação, dificultando assim a visualização desse fenômeno por meio do ensaio de reação acrossômica induzida pelo Ca^{2+} Ion. É importante lembrar que o DMSO é utilizado nesse ensaio pois apresenta um alto coeficiente de permeabilidade na membrana plasmática e age como um carreador (MALLORY et al., 1998), visando no presente estudo facilitar a entrada do Ca^{2+} Ion no meio intracelular.

No tocante ao sistema de incubação, ainda que esse detalhe metodológico não seja explicitado no trabalho de Long et al. (1996), é importante ressaltar que a indução da reação acrossômica pelo Ca^{2+} Ion geralmente é realizada em microgotas, sob óleo mineral, de forma idêntica aos sistemas utilizados para fecundação *In vitro*. No presente experimento, um pequeno volume da suspensão de células (60 μL) foi incubado em tubos de microcentrífuga sem nenhum tipo de cobertura sobre o meio de cultivo para evitar a evaporação do líquido presente no mesmo. Ainda que a

incubadora apresente ambiente humidificado, que evita a perda excessiva de líquido por evaporação, esse pode ter sido um fator negativo ao sistema de incubação, que pode ter levado ao aumento da concentração de solutos no meio de cultivo e com isso pode ter diminuído a integridade das membranas dos espermatozóides.

Possivelmente outra importante causa da perda de viabilidade devida à incubação foi o tempo de excessivamente longo dessa etapa (30 minutos). Esta hipótese se baseia no fato de que De Jonge, Mack e Zaneveld (1989), em seu estudo visando otimizar o sistema de avaliação da capacitação espermática do sêmen humano por meio da reação acrossômica induzida pelo cálcio ionóforo, incubaram os espermatozóides por apenas 15 minutos, verificando boa manutenção da motilidade espermática mesmo quando utilizaram concentrações de Ca^{2+} Ion de até 30 μM . Tal como no presente estudo, Long et al. (1996) incubaram os espermatozóides na presença do Ca^{2+} Ion por 30 minutos e, da mesma forma, verificaram sempre redução da viabilidade espermática associada à redução da integridade acrossomal.

Dessa forma, a redução da concentração de cálcio ionóforo utilizada no presente estudo e no estudo de Long et al. (1996); em relação ao estudo de De Jonge, Mack e Zaneveld (1989); pode ter levado a uma diminuição do efeito da incubação sobre a integridade acrossomal. Simultaneamente, o aumento do tempo de incubação, em relação ao utilizado naquele mesmo estudo, possivelmente levou a uma maior perda de viabilidade espermática, tornando assim mais difícil evidenciar a ocorrência do fenômeno de capacitação espermática no presente estudo.

Se analisados isoladamente, cada um dos três fatores acima parece fornecer fraca sustentação para a compreensão da perda de integridade das membranas espermáticas durante a incubação. No entanto, se considerados simultaneamente, pode-se observar que estes fatores estão todos interligados, já que a incubação de um baixo volume de meio de cultivo, desprovido da cobertura do óleo mineral, por um tempo excessivo, pode levar a um aumento da concentração de solutos além do que seria desejado, prolongando e intensificando dessa forma os efeitos negativos do DMSO e demais substâncias deletérias aos espermatozóides, eventualmente presentes no meio de cultivo.

Outra abordagem interessante na realização desse tipo de estudo envolve a utilização de colorações que permitam a verificação simultânea, em uma mesma

célula, da viabilidade e da integridade acrossomal (YANAGIMACHI, 1994). Tal abordagem permitirá a quantificação direta da reação acrossômica, tornando possível distinguir os espermatozoides mortos dos verdadeiramente reagidos; assim, ainda que haja uma redução significativa da motilidade espermática, será possível obter conclusões quanto ao efeito dos tratamentos avaliados sobre a reação acrossômica e a capacitação espermática.

5.4 EXPERIMENTO 3: Comparação das Técnicas de Avaliação da Integridade Acrossomal e Viabilidade Espermática

Visando investigar a eficiência de uma técnica de marcação fluorescente que permitisse a avaliação mais criteriosa da capacitação espermática e reação acrossômica dos espermatozoides da jaguatirica, pela determinação simultânea, em uma mesma célula espermática, da integridade acrossomal e viabilidade espermática, a técnica fluorescente mista composta pela marcação com a Aglutinina do Amendoim (*Arachys hypogaea*) conjugada ao Isotiocianato de Fluoresceína e associada ao Iodeto de Propídeo (FITC – PNA / IP), foi comparada à Coloração Simples associada à avaliação do Índice de Motilidade Espermática; como pode ser observado pelos resultados abaixo.

5.4.1 Coloração Simples

Resultados quantitativos: A seguir, na **Tabela 5.4.1**, estão as proporções de espermatozoides com acrossomos intactos (AI) obtidas por meio do Coloração Simples. Nessa tabela pode-se verificar que houve uma queda gradativa e significativa ($p < 0,0001$; ANOVA) na proporção de espermatozoides apresentando acrossomos intactos com o decorrer do tempo, como pode ser melhor visualizado na **Figura 5.4.1**.

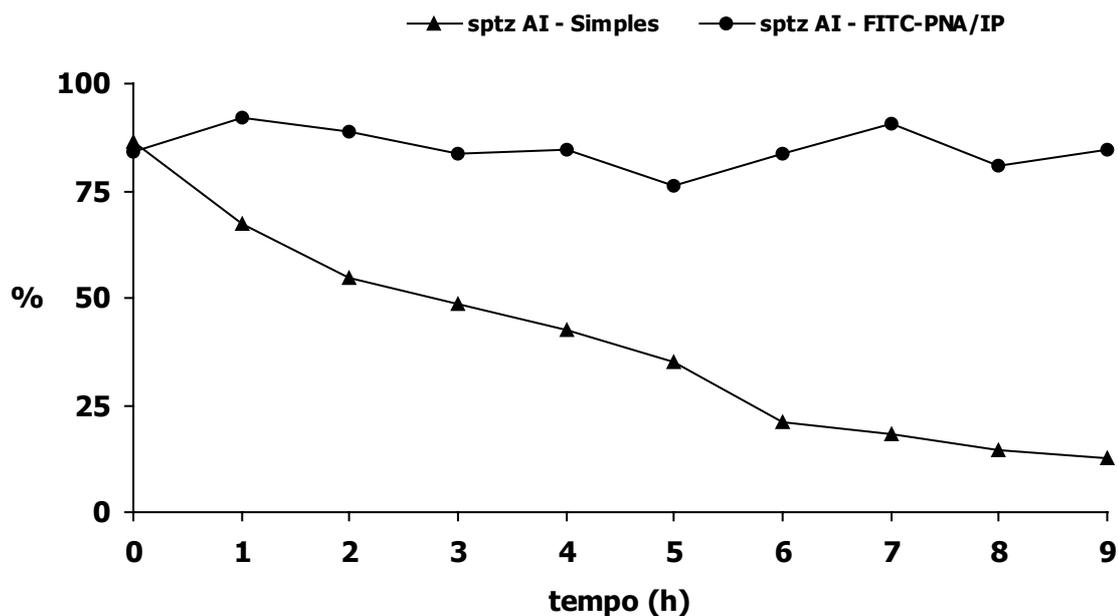


Figura 5.4.1 - Gráfico representativo da variação da proporção de espermatozoides de jaguatirica apresentando acrossomos intactos avaliados pela Coloração Simples e pela técnica FITC-PNA/IP, em função do tempo de pré-incubação. Jundiaí / São Paulo, 2002/2003

Tabela 5.4.1 - Médias (\pm desvio padrão) das proporções de espermatozoides de jaguatirica apresentando acrossomo intacto (AI), avaliados através da Coloração Simples, ao longo do tempo de pré-incubação. Jundiaí / São Paulo, 2002/2003

^{a,b,c,d} Letras sobrescritas diferentes, indicam diferenças significativas ($p < 0,05$; ANOVA, "SAS for Windows").

Alíquota (h)	Nº de amostras observadas	Média de sptz AI (%)
0	4	86,38 (\pm 6,14) ^a
1	3	67,34 (\pm 15,07) ^{a, b}
2	5	54,80 (\pm 27,45) ^{a,b,c}
3	4	48,50 (\pm 26,42) ^{a,b,c,d}
4	4	42,38 (\pm 19,10) ^{a,b,c,d}
5	4	35,08 (\pm 17,10) ^{a,b,c,d}
6	4	21,25 (\pm 7,60) ^{b,c,d}
7	2	18,25 (\pm 4,60) ^{b,c,d}
8	2	14,38 (\pm 1,24) ^{c,d}
9	2	12,75 (\pm 6,72) ^d

Resultados qualitativos: Nas **Figuras 5.4.2 e 5.4.3**, pode-se visualizar as categorias de espermatozoides observadas após a Coloração Simples, neste trabalho. Essa técnica, descrita por Pope, Zhang e Dresser (1991), se mostrou bastante eficiente e prático para ser utilizado em condições de campo. O preparo da solução corante foi o mais simples dentre as técnicas comparadas neste trabalho e, além disso, a etapa de coloração é única e bastante rápida. Outra vantagem desta técnica consiste em poder guardar os esfregaços corados por períodos superiores a 30 dias, diferentemente da técnica de fluorescência que exige a leitura imediata. Por fim, o exame das lâminas pode ser feito em microscópio de luz, equipamento mais barato e acessível do que o de microscópio epifluorescência utilizado na técnica FITC-PNA/IP. Essas características conferem à técnica atributos ideais para aplicação a campo.



Figura 5.4.2 - Fotomicrografia de espermatozóide de jaguatirica apresentando acrossomo intacto, evidenciado pela Coloração Simples de Pope, obtida em Microscópio Olympus BX50, utilizando objetiva apocromática de aumento igual a 100x. Jundiá / São Paulo, 2002



Figura 5.4.3 - Fotomicrografia de espermatozóide de jaguatirica corado pela Coloração Simples de Pope, obtida em Microscópio Olympus BX50, utilizando objetiva apocromática de aumento igual a 100x. Jundiá / São Paulo, 2002

5.4.2 FITC-PNA/IP

Resultados quantitativos: Analisando-se a proporção de espermatozoides vivos nesta coloração, os valores obtidos variaram aleatoriamente no decorrer do tempo, ora decaindo, ora aumentando, não sendo observado efeito significativo ($p = 0,1036$; ANOVA) do tempo de pré-incubação sobre esses valores, como pode ser observado na **Figura 5.4.3**, abaixo.

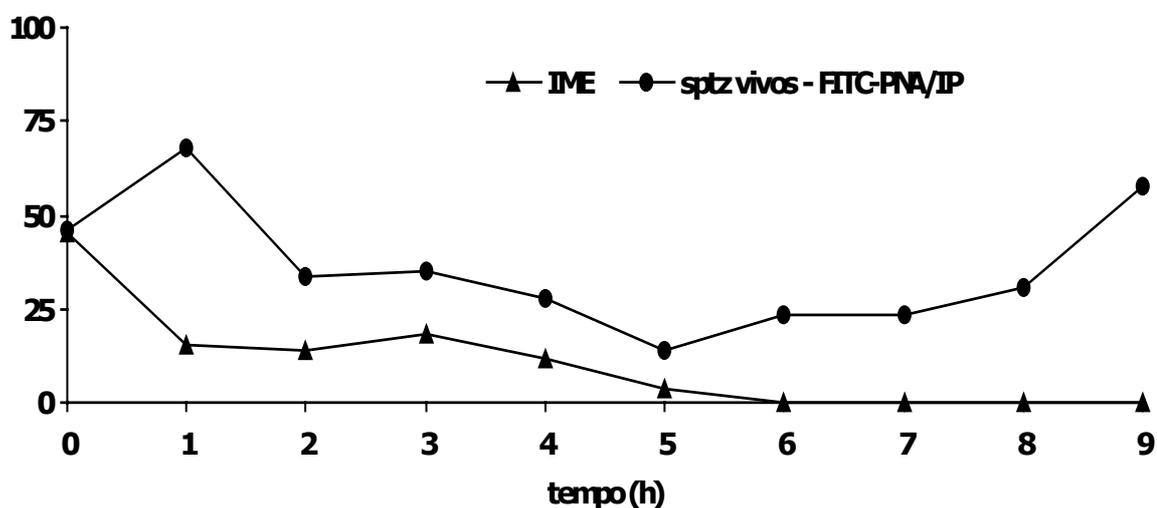


Figura 5.4.4 - Gráfico representativo da variação do IME e da proporção de espermatozoides de vivos (%) avaliados pela técnica FITC-PNA/IP, em função do tempo de pré-incubação do sêmen de jaguatirica. Jundiaí / São Paulo, 2002/2003

Da mesma forma, não foi verificado efeito significativo ($p = 0,8910$; ANOVA) do tempo de pré-incubação sobre a proporção de espermatozoides apresentando acrossomo intacto (AI). Como pode ser melhor observado no **Figura 5.4.1**, acima, esses valores variaram na faixa entre 75 e 95 %.

Quanto às proporções de espermatozoides com acrossomos intactos (AI), os valores obtidos estão na **Tabela 5.4.2**, a seguir.

Tabela 5.4.2 - Médias (\pm desvio padrão) de espermatozóides de jaguatirica com acrossomo intacto (AI) observados através da coloração FITC-PNA/IP (%). Jundiá / São Paulo, 2002/2003

Alíquota (h)	Nº de amostras observadas	Média (%)
0	4	83,91 (\pm 8,66)
1	3	92,17 (\pm 4,73)
2	5	88,71 (\pm 13,01)
3	4	83,50 (\pm 13,50)
4	4	84,63 (\pm 10,00)
5	4	76,25 (\pm 16,68)
6	4	83,88 (\pm 20,63)
7	2	90,50 (\pm 2,12)
8	2	80,75 (\pm 25,10)
9	2	84,75 (\pm 16,62)

Resultados qualitativos: Nas **Figuras 5.4.5, 5.4.6, 5.4.7, 5.4.8 e 5.4.9**, pode-se visualizar as categorias de espermatozóides observadas após a coloração com FITC-PNA/IP, neste trabalho.

As fotomicrografias representativas desta técnica foram obtidas a partir de um microscópio Nikon Eclipse E800, ou seja, diferente daquele utilizado para se fazer a leitura e quantificação das categorias de espermatozóides marcados. Neste microscópio onde foram efetivamente realizadas as leituras (Olympus CH 30), utilizou-se o filtro duplo que captava a fluorescência emitida pelo FITC-PNA e pelo IP, ou seja, era possível visualizar estruturas marcadas pelos dois fluorocromos simultaneamente. Todavia, a máquina fotográfica acoplada a esse microscópio não estava funcionando adequadamente e, por isso, foi necessário fazer a mudança de microscópio para se obter as fotomicrografias.

No microscópio que foi utilizado para se obter essas imagens (Nikon Eclipse E800), o único filtro que possibilitava a visualização de estruturas marcadas pelos dois fluorocromos simultaneamente era o filtro triplo e, dessa forma, foi captada um terceiro comprimento de onda de luz fluorescente, apresentando cor azul (**Figuras 5.4.5, 5.4.7, 5.4.8 e 5.4.9**).

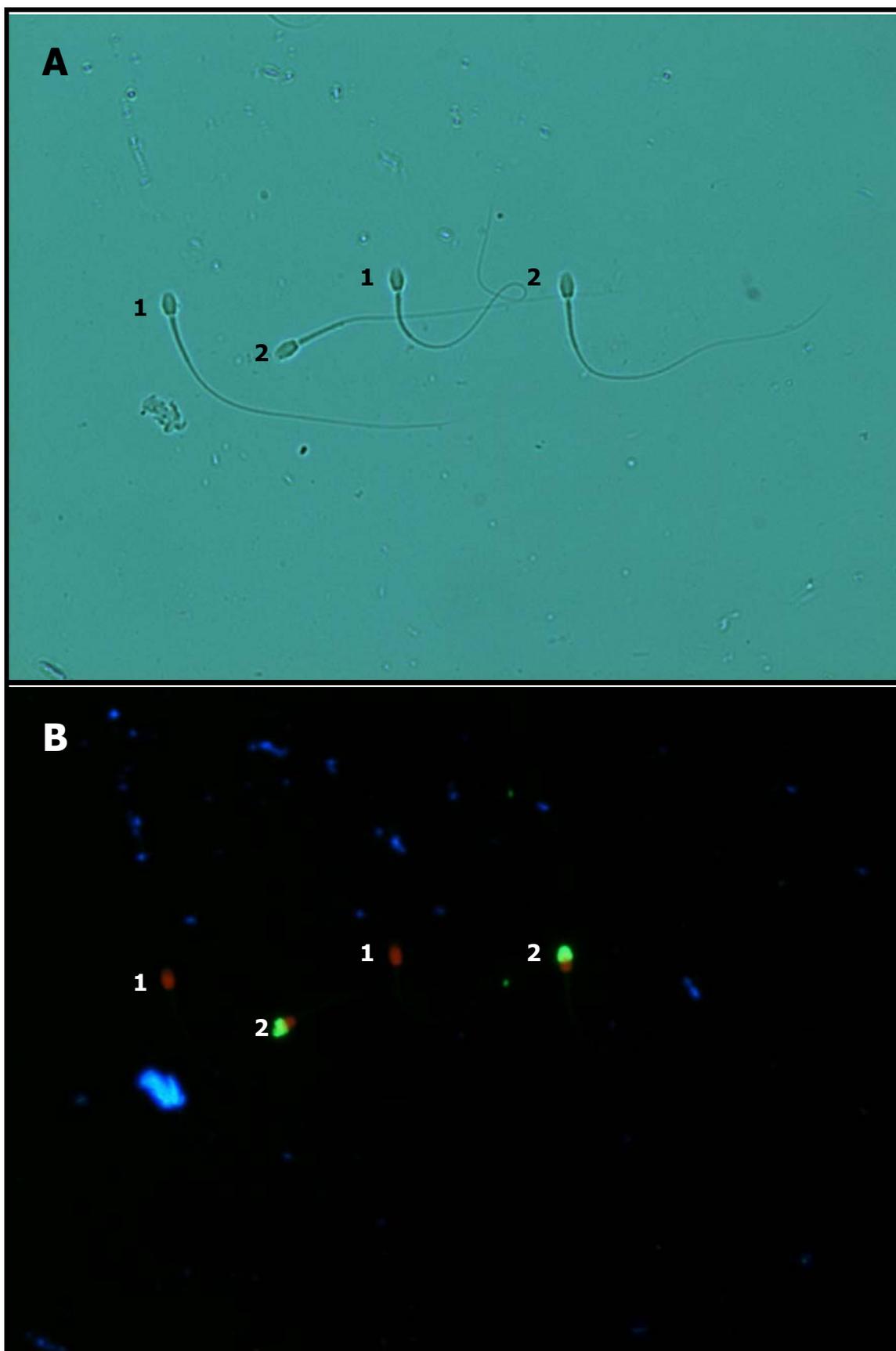


Figura 5.4.5 – Fotomicrografias de espermatozoides de jaguaritica avaliados pela técnica FITC-PNA / IP em **A** campo claro e em **B** sob iluminação fluorescente evidenciada por filtro triplo. **1** – espermatozoides mortos com acrossomos intactos; **2** – espermatozoides mortos com acrossomos ausentes (reagidos ou degenerados). Jundiá / São Paulo, 2003

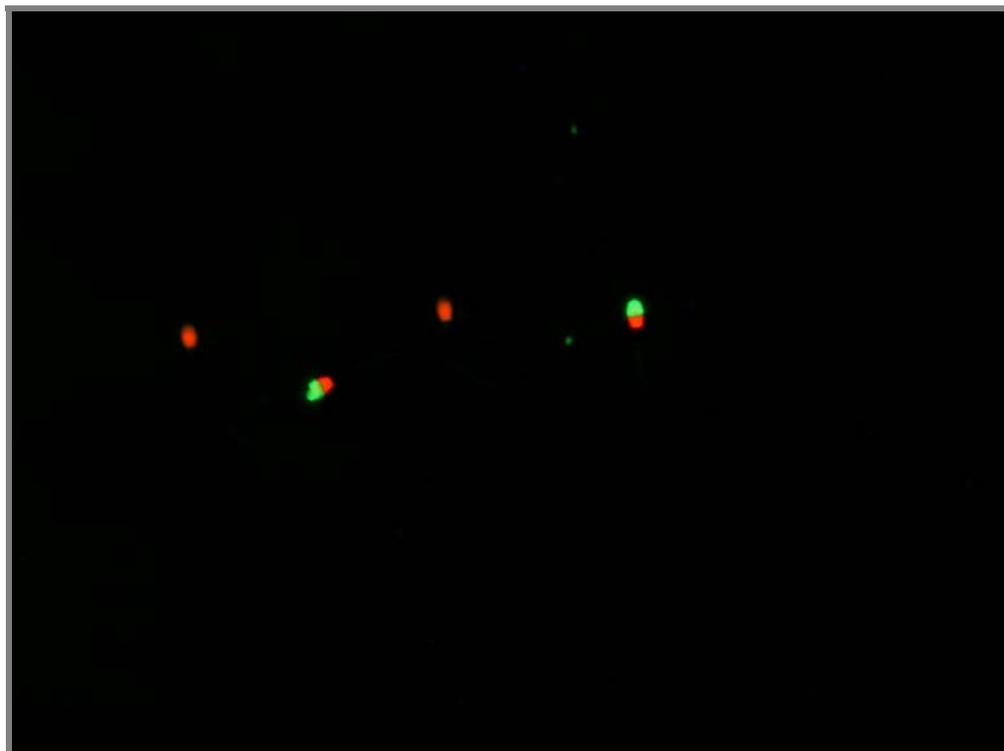


Figura 5.4.6 – Fotomontagem obtida a partir da sobreposição de duas fotomicrografias de espermatozoides de jaguatirica avaliados pela técnica FITC-PNA / IP sob iluminação fluorescente, em uma delas utilizando filtro para fluoresceína e na outra filtro para iodeto de propídeo. O campo registrado é o mesmo da Figura 5.4.4. Jundiaí / São Paulo, 2003

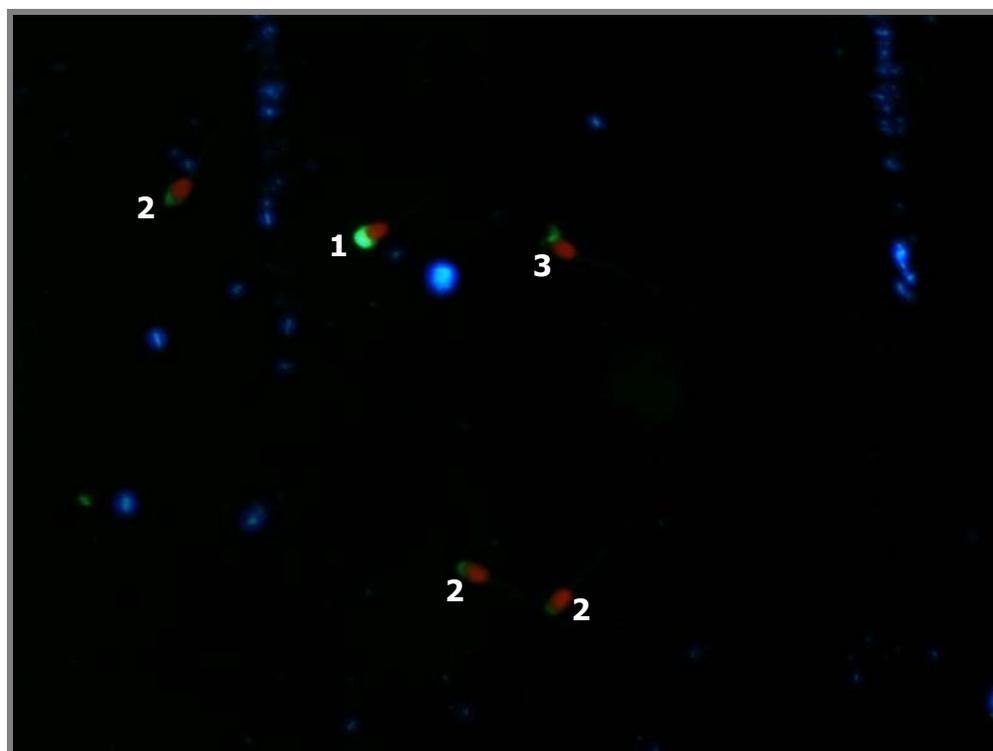


Figura 5.4.7 - Fotomicrografia de espermatozoides de jaguatirica avaliados pela técnica FITC-PNA / IP em campo escuro, sob iluminação fluorescente evidenciada por filtro triplo. **1** – espermatozóide morto com acrossomo evidentemente ausente; **2** – espermatozóides mortos com acrossomos possivelmente ausentes; **3** – espermatozóide morto com acrossomo de classificação duvidosa. Jundiaí / São Paulo, 2003

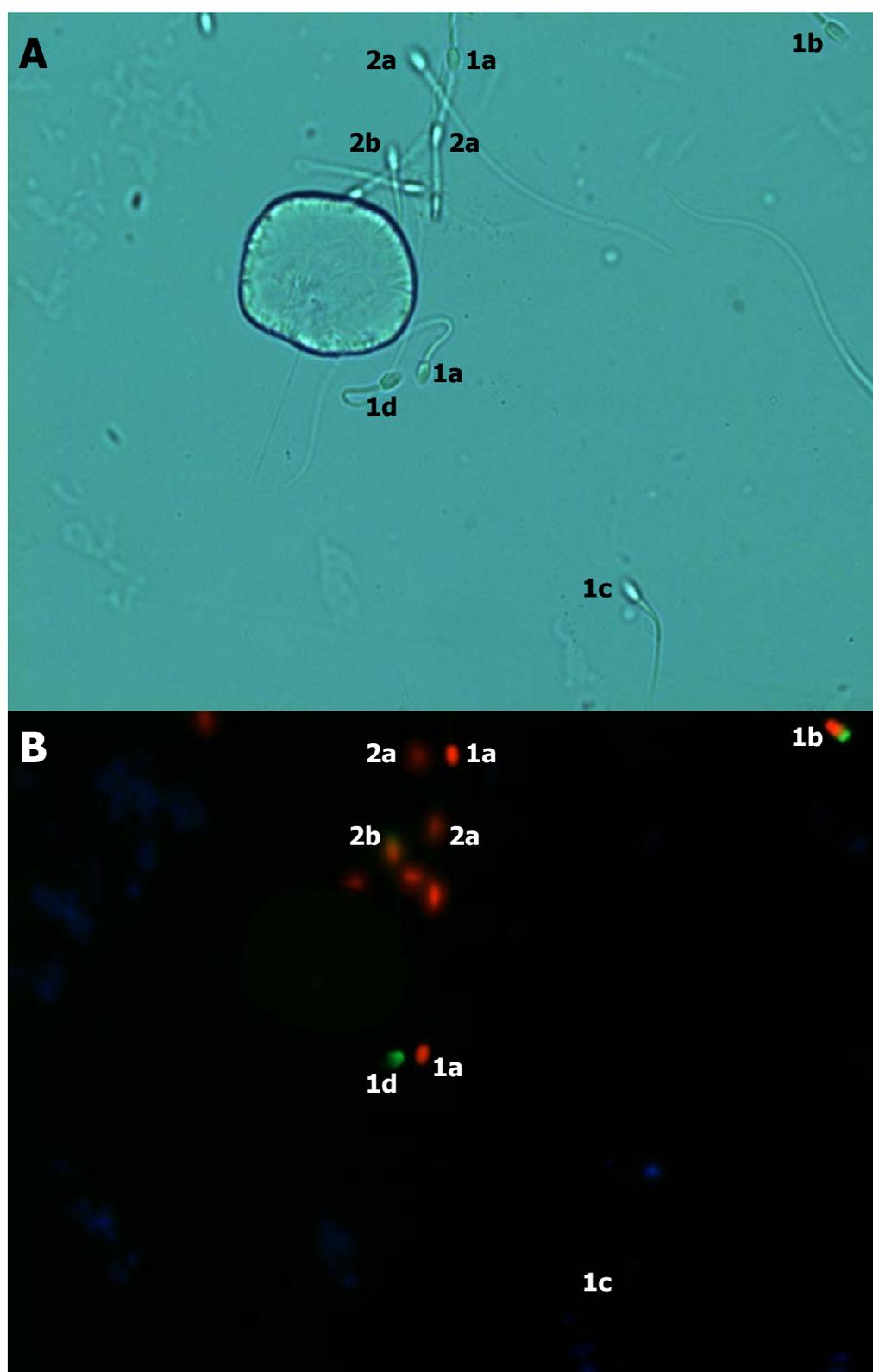


Figura 5.4.8 – Fotomicrografias de espermatozóides de jaguar avaliados pela técnica FITC-PNA / IP em **A** campo claro e em **B** sob iluminação fluorescente evidenciada por filtro triplo. **1** – Categorias evidentes: **a** – espermatozóides mortos com acrossomos intactos; **b** – espermatozóide morto com acrossomo ausente; **c** – espermatozóide vivo com acrossomo intacto; **d** - espermatozóide vivo c/ acrossomo reagido. **2** – Categorias duvidosas: **a** – espermatozóides mortos com acrossomos intactos (?); **b** – espermatozóide morto com acrossomo ausente (?). Jundiaí / São Paulo, 2003

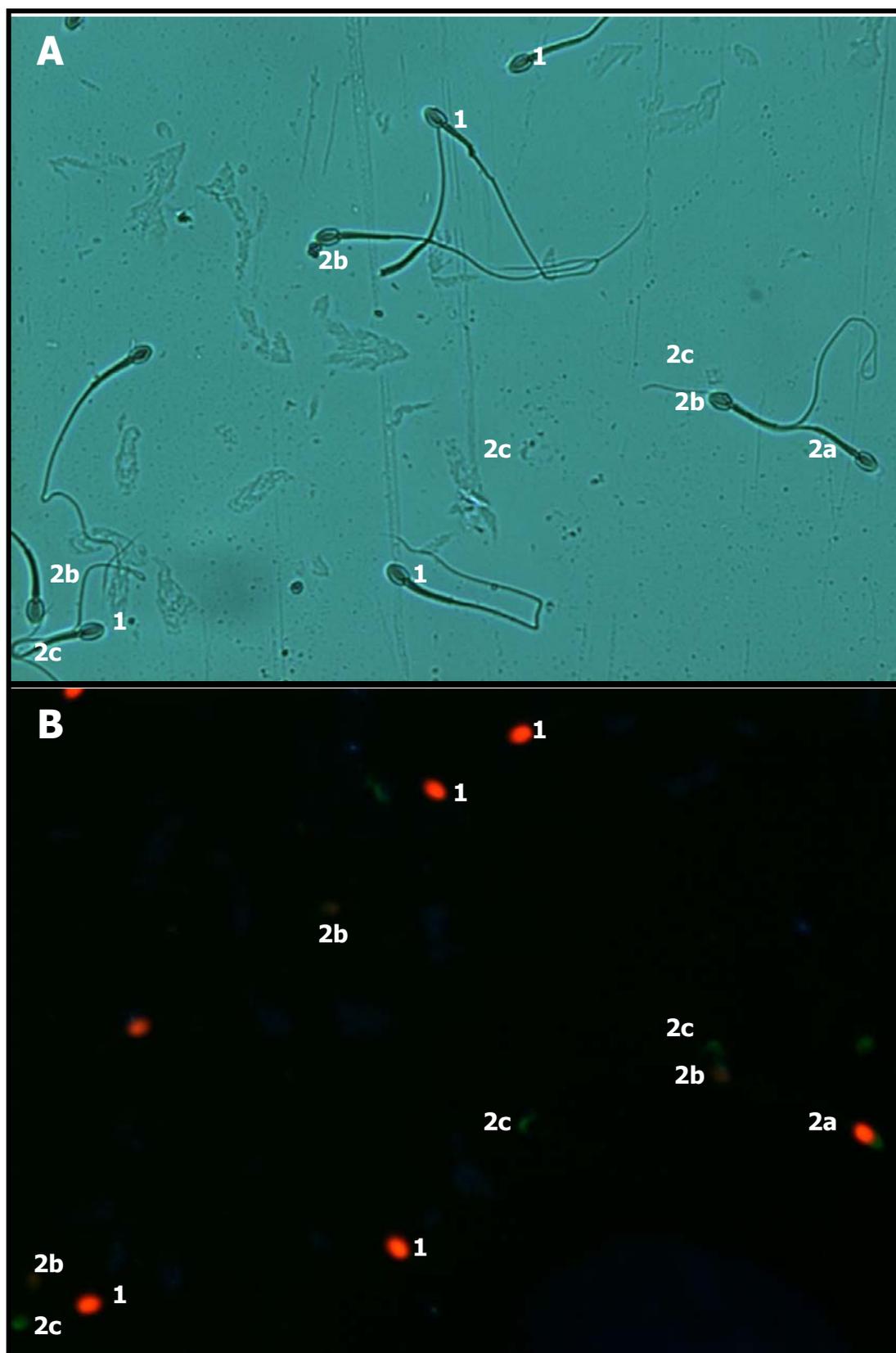


Figura 5.4.9 – Fotomicrografias de espermatozoides de jaguar avaliados pela técnica FITC-PNA / IP em **A** campo claro e em **B** sob iluminação fluorescente evidenciada por filtro triplo. **1** – Espermatozoides mortos com acrossomos intactos; **2** – Categorias duvidosas: **a** – espermatozói­de morto com acrossomo ausente (?); **b** – espermatozoides vivos (?) com acrossomos intactos (?); **c** – acrossomos soltos (?). Jundiá / São Paulo, 2003

Essa fluorescência azul foi emitida apenas por estruturas que consistiram de artefatos de técnica. Como essas estruturas não foram visualizadas na leitura de rotina para obtenção dos dados expostos neste trabalho, foi feita uma fotomontagem através da sobreposição de duas fotomicrografias obtidas nesse mesmo microscópio, porém utilizando-se outros filtros: um que capta apenas fluorescência emitida por estruturas ligadas ao FITC-PNA e outro que capta apenas fluorescência emitida por estruturas ligadas ao IP. Essa fotomontagem foi feita com o intuito de se demonstrar de forma didática o que realmente era visualizado na leitura rotineira das lâminas (**Figura 5.4.5**).

Técnicas de fluorescência são descritas como preferenciais para a marcação de espermatozoides na avaliação de viabilidade e integridade acrossômica (CROSS; MEIZEL, 1989). No entanto, a técnica mista FITC-PNA / IP se mostrou complexa e laboriosa, a começar pela limpeza das lâminas e lamínulas. Estas deveriam estar muito bem limpas e livres de resíduos gordurosos, pois, do contrário, haveria a inviabilização da leitura. Isto se deve ligação do marcador fluorescente do corante às partículas de gordura (por vezes maiores que os espermatozoides), as quais, dessa forma, iriam fluorescer durante a contagem sob epifluorescência e impedir a visualização adequada das diferentes categorias de células marcadas.

Ainda com relação ao surgimento de artefatos de técnica, houve bastante dificuldade de se efetuar a leitura de algumas amostras com maior quantidade de grumos presentes no sêmen. Tais grumos podem ter sido devidos à presença de debris celular no sêmen ou resíduos da gema de ovo e de açúcares provenientes do PDV, que não teriam sido adequadamente removidos pela lavagem na etapa de processamento do sêmen. Os fluorocromos se ligam a essas substâncias, o que dificulta a visualização adequada de alguns espermatozoides, tendo esse inconveniente da técnica sido citado por Cunha (2002).

Outro dificuldade encontrada, foi o fato da técnica exigir leitura imediata, já que segundo Harrison e Vickers (1990) a concentração de formaldeído utilizada na solução de trabalho objetiva apenas cessar a motilidade, mantendo as células vivas. Segundo esses autores, o efeito imobilizante do formaldeído é presumivelmente mediado por interações reversíveis com os grupos amino da superfície do espermatozoide. Segundo Dott, Moor e Polge (1976), espermatozoides assim

imobilizados podem ser lavados para remoção do formaldeído, permanecendo potencialmente férteis após esse processamento. Além disso, a intensidade da fluorescência emitida pelos fluorocromos diminui com o passar do tempo e, após uma hora, os resultados obtidos já poderiam apresentar alterações significativas (HARRISON; VICKERS, 1990).

É importante ressaltar que tanto o FITC-PNA quanto o IP são tóxicos (teratogênicos e carcinogênicos) (SIMGA-ALDRICH, 2002) devendo-se ter sempre cuidado especial na manipulação dessas substâncias, principalmente no caso de mulheres grávidas. Outro ponto desfavorável é o custo bastante elevado, tanto do microscópio quanto dos fluorocromos exigidos por essa técnica, quando em comparação à Coloração Simples.

O grau de subjetividade na leitura de sêmen em lâminas coradas por essa técnica foi grande. Esse fato ocorreu pois, além de haver amostras em que eram encontrados artefatos de técnica que dificultavam a leitura, a distinção das diferentes categorias de espermatozoides marcados não foi tão evidente como descrito na literatura (CROSS; MEIZEL, 1989). Houve muitos casos de espermatozoides pertencentes a categorias duvidosas, em que a intensidade da fluorescência vermelha visível (resultado da ligação do fluorocromo iodeto de propídeo) foi muito tênue, mesmo em campos em que se podia observar outros espermatozoides fluorescendo intensamente em vermelho, o que gerou dúvida quanto a considerá-lo morto ou não. Os espermatozoides observados na **Figura 5.4.7** exemplificam esse tipo de discrepância. No entanto, durante as leituras, houveram células apresentando marcação ainda mais tênue pelo iodeto de propídeo. Dessa forma, o resultado da leitura poderia ter sido influenciado pela sensibilidade visual do observador e do critério utilizado pelo mesmo.

Esse mesmo tipo de subjetividade foi também verificado para a lecitina fluorescente FITC-PNA, sendo observados no mesmo campo em várias ocasiões, acrossomos fluorescendo com intensidades variáveis (**Figura 5.4.7**). Diferentemente do IP, que sempre marcava toda a extensão do núcleo do espermatozoide, a marcação por essa lecitina fluorescente podia compreender desde um pequeno ponto, até toda a extensão da região acrossomal (**Figura 5.4.6**). A padronização da classificação do acrossomo ausente, como aquele que apresentava ao menos metade

da região acrossomal fluorescente, a partir do ápice, diminui a subjetividade da interpretação devida a esse inconveniente, porém não a eliminou totalmente, já que a leitura era realizada em aumento de 400 vezes, através do qual a região acrossomal apresenta-se bem pequena, tornando difícil determinar com precisão a metade de sua extensão.

Outra dificuldade encontrada, ainda em relação com a marcação fluorescente dos acrossomos, foi o fato de que eram encontrados muitos acrossomos destacados fluorescendo em verde, ou seja, não aderidos a um espermatozóide e sem espermatozóides por perto (**Figura 5.4.8**). Durante algumas leituras sob luz fluorescente, foi possível visualizar alguns espermatozóides vermelhos com acrossomos verdes cujos acrossomos subitamente se destacaram fazendo com que esses espermatozóides passassem a ser classificados como mortos com acrossomo intacto. Certamente todos os inúmeros acrossomos destacados, que foram observados fluorescendo no campo escuro originaram-se de espermatozóides que estavam presentes na amostra avaliada. Tais espermatozóides foram então classificados como apresentados acrossomos intactos, já que a fluorescência verde não era observada, não sendo possível dessa forma distinguir espermatozóides com acrossomos destacados de espermatozóides com acrossomos íntegros. Isso explicaria o fato da taxa de espermatozóides apresentando acrossomos intactos (não fluorescentes) verificada por essa técnica ter sido constantemente elevada, mesmo em amostras em que a Coloração Acrossomal Simples indicou baixa proporção de acrossomos íntegros.

Todas essas incoerências constatadas, sugerem que a metodologia não foi adequada à efetiva observação das alterações nas membranas plasmática e acrossomal dos espermatozóides; ainda que a técnica tenha sido executada, criteriosamente, de acordo com a metodologia descrita por Cunha (2002).

5.4.3 Correlações

Todas as variáveis analisadas foram testadas para verificar a presença de correlação entre elas. Dessa forma, constatou-se que os valores do índice de motilidade espermática e da proporção de espermatozóides vivos detectados pela técnica FITC-PNA/IP (**Figura 5.4.4**, acima) não estavam significativamente correlacionados, ($r = 0,12$; $p = 0,59$). Esse resultado foi reforçado ao se comparar as duas variáveis por meio do teste de Wilcoxon, o qual demonstrou que suas médias (IME = 13.38 ± 22.3 ; % vivos FITC-PNA/IP = 34.46 ± 23.6) foram significativamente diferentes ($p < 0,0001$).

O mesmo ocorreu ao se analisar as proporções de espermatozóides com acrossomo intacto verificados pela Coloração Simples e pela técnica FITC-PNA / IP (**Figura 5.4.1**, acima). Não se observou correlação significativa entre esses dois métodos ($r = 0,08$, $p = 0,64$), para esse parâmetro. Do mesmo modo, ao se analisar essas variáveis (AI Coloração Simples - $44,15 \pm 27,47$; AI FITC-PNA/IP - $84,73 \pm 12,86$) pelo teste de Wilcoxon, não se verificou semelhança entre elas ($p < 0,0001$).

As únicas variáveis que demonstraram correlação significativa entre si ($r = 0,77$; $p < 0,0001$) foram o índice de motilidade espermática e a proporção de espermatozóides com acrossomo intacto verificada pela Coloração Simples, como pode ser melhor visualizado na **Figura 5.4.9**, a seguir.

A diminuição da proporção de espermatozóides vivos e conseqüente redução do índice de motilidade espermática ao longo do tempo de incubação *In vitro*, já foram observadas por vários autores, utilizando diferentes sistemas de incubação de espermatozóides de várias espécies (BYERS et al., 1989; DE JONGE; MACK; ZANEVELD, 1989; HARRISON, 1996; HOWARD, 1993; LONG et al., 1996; RODRIGUEZ - MARTINEZ et al., 1997; ROTA et al.; 1999). A redução simultânea da proporção de espermatozóides apresentando acrossomos íntegros, já foi também demonstrada por alguns desses autores, sendo explicada pela ocorrência da capacitação espermática e reação acrossômica espontânea, ou mesmo pela simples degeneração "post mortem" do acrossomo (LONG et al., 1996; ROTA et al.; 1999; YANAGIMACHI, 1994).

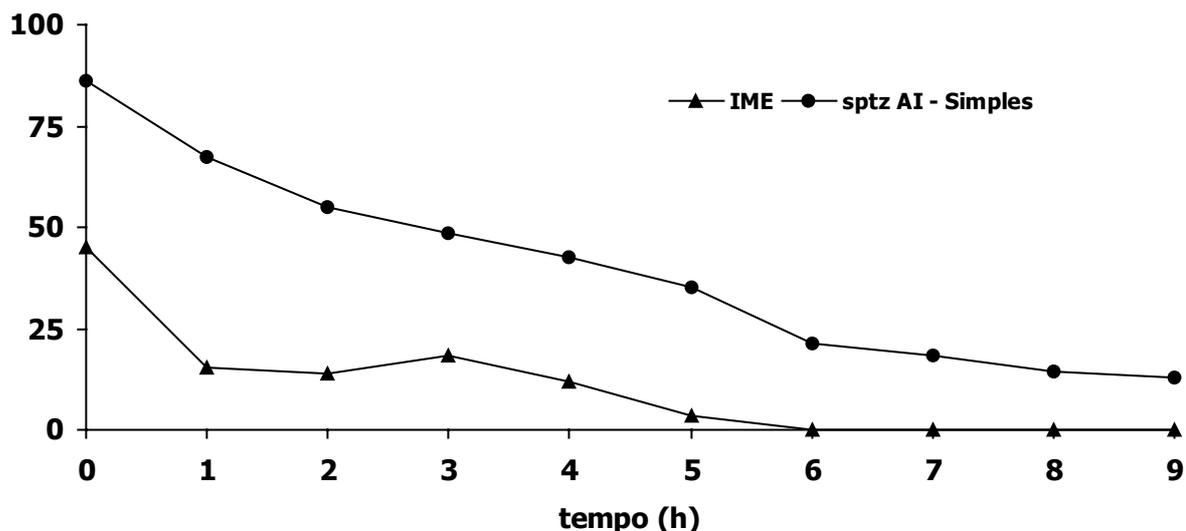


Figura 5.4.9 - Gráfico representativo da variação do IME e da proporção de espermatozoides de jagatirica apresentando acrossomos intactos (%), avaliados pela Coloração Simples, em função do tempo de pré-incubação. Jundiaí / São Paulo, 2002/2003

No que diz respeito aos resultados quantitativos da técnica FITC-PNA / IP, era de se esperar que, nas alíquotas em que o índice de motilidade espermática era alto, a proporção de espermatozoides vivos, determinada pela técnica fluorescente também o estivesse. Porém os valores determinados por essa técnica foram totalmente contraditórios aos obtidos na análise do índice de motilidade espermática. Como foi colocado anteriormente isso possivelmente deve-se a alguma inadequação da técnica utilizada.

No entanto, as causas específicas das incoerências observadas, são muito difíceis de serem determinadas. Seria bastante lógico supor que algum dos reagentes empregados na solução de trabalho tenha sido responsável pela morte dos espermatozoides por estar contaminado ou em desacordo com suas especificações. Excetuando os fluorocromos, os demais reagentes foram trocados por produtos novos e garantidos, porém não foi verificada melhora nos resultados. Além disso, esta parece ser uma análise bastante simplista.

A metodologia desenvolvida por Harrison e Vickers (1990), como foi colocado anteriormente, não matava os espermatozoides, apenas impedia-os de se mover. Isto indica que as células assim imobilizadas estavam ainda sujeitas aos efeitos nocivos das condições ambientais; fossem elas, variações de temperatura, de luminosidade ou evaporação da solução de trabalho e conseqüente aumento da

osmolaridade. Além disso o citrato de sódio, utilizado nessa solução para promover a correta osmolaridade, possui fraca ação tamponante. Por essas razões, pode-se supor que a manutenção dos espermatozoides nessa solução venha a ser responsável pela morte dos mesmos em um intervalo de tempo reduzido. Conseqüentemente, a degeneração *post mortem* dos acrossomos poderia também ser verificada.

A técnica empregada por Harrison e Vickers (1990) diferiu da técnica FITC - PNA / IP utilizada no presente apenas em relação ao fluorocromo diacetato de carboxifluoresceína, utilizado ao invés da aglutinina fluorescente FITC-PNA, sendo o restante da solução idêntica à utilizada no presente experimento. Os autores verificaram que o sêmen de carneiro quando mantido por até 130 minutos na solução de trabalho apresentava a mesma redução de viabilidade observada para uma amostra controle mantida nas mesmas condições, sendo exposta à solução corante apenas 10 min antes da avaliação. Isso indicou que a queda na integridade de membranas observada nesse estudo após 100 minutos de exposição à solução de trabalho, deve-se à senescência natural dos espermatozoides e não a efeitos tóxicos dessa solução (HARRISON; VICKERS, 1990).

Ao comparar a eficiência do Iodeto de Propídeo com o fluorocromo Hoescht 33258 e a solução corante Eosina – Nigrosina – Giemsa, na avaliação da proporção de espermatozoides viáveis de touros e de cachacos, Pintado, Fuente e Roldan (2000) verificaram que a proporção de células mortas indicada pelo Iodeto de Propídeo foi sempre mais elevada que a indicada pelas outras duas técnicas. Essa característica foi independente do processamento prévio a que o sêmen havia sido submetido. Tal diferença entre a proporção de células viáveis determinadas pelo Iodeto de Propídeo e pela Eosina, está em conformidade com outro estudo do sêmen de carneiros e cachacos (TAMULI; WATSON, 1994). Outros estudos demonstraram também diferenças entre sondas fluorescentes e o corante Eosina na avaliação da viabilidade espermática (CASSINELLO et al., 1998; CENTOLA et al., 1990). Pintado, Fuente e Roldan (2000) e Tamuli e Watson (1994) apontam como uma possível causa para essa discrepância, a sensibilidade das células espermáticas, descrita por Woelders (1991), aos efeitos tóxicos inerentes a algumas sondas fluorescentes.

Além disso, um estudo do efeito das condições de manipulação *In vitro* do sêmen de leopardos das neves (ROTH et al., 1996), demonstrou que existe grande variação interespecífica na sensibilidade às condições de cultivo do sêmen das espécies da família Felidae. Os autores verificaram que a adição de bicarbonato de sódio a um meio de cultivo comum (PBS) ou a simples elevação do pH desse meio prejudicavam dramaticamente a viabilidade dos espermatozoides dessa espécie, diferentemente de várias outras espécies de felídeos estudadas pelos autores.

Considerando que a distância filogenética entre as espécies comparadas no estudo acima seja menor do que a distância filogenética entre a jaguatirica e o cão, espécie com a qual a técnica de imobilização pelo formaldeído foi utilizada com sucesso (CUNHA, 2002); a suposição de que o sêmen jaguatirica apresenta uma maior sensibilidade à exposição prolongada a essa solução fluorescente, parece ser uma justificativa plausível para compreender a incoerência na variação dos padrões de marcação pela técnica fluorescente FITC-PNA / IP, ao longo do tempo de pré-incubação. Estudos investigando especificamente esta hipótese, no entanto, devem ser conduzidos.

Outros argumentos teóricos podem reforçar tal hipótese, como o fato de que o sêmen felino não necessita de qualquer agente estimulante específico para completar a capacitação espermática *In vitro*, além de requerer períodos de pré-incubação consideravelmente menores do que a maior parte das demais espécies mamíferas (LONG et al., 1996). Considerando-se que a capacitação envolve a diminuição da estabilidade da membrana plasmática (HARRISON, 1996), é possível supor que o sêmen felino seja naturalmente mais sensível a disruptores extracelulares da função de suas membranas.

Por fim, cabe destacar que os resultados observados por meio da Coloração Simples corresponderam àquilo que era esperado de acordo com a lógica da dinâmica do fenômeno biológico de capacitação e morte dos espermatozoides.

6. CONCLUSÕES

Com base nos achados experimentais do presente estudo e na literatura consultada, pode-se concluir que:

- Durante a contenção química das jaguatiricas para realização da eletroejaculação, não foi verificada influência do uso do anestésico inalatório isoflurano sobre a ocorrência de contaminação do ejaculado por urina;
- O ejaculado obtido por meio do protocolo adaptativo de eletroejaculação, descrito no presente trabalho, apresenta características semelhantes ao ejaculado obtido pelo protocolo padronizado de eletroejaculação exceto pela concentração espermática do sêmen, que foi 3 a 10 vezes mais elevada pela utilização do protocolo adaptativo em comparação aos valores encontrados na literatura;
- O transporte do sêmen da jaguatirica por duas horas a temperatura ambiente foi menos deletério à integridade estrutural e funcional dos espermatozóides que seu transporte sob refrigeração;
- Os espermatozóides da jaguatirica se mostraram sensíveis aos efeitos nocivos da exposição a baixas temperaturas e apresentaram alterações semelhantes às aquelas observadas em espermatozóides afetados pelo Choque do Resfriamento;
- O sistema de refrigeração desenvolvido no presente estudo (Equitainer Modificado) permitiu a obtenção de uma taxa de diminuição da temperatura próxima aos valores considerados ideais para o resfriamento do sêmen de carnívoros domésticos, tendo se mostrado ainda um sistema de prática aplicação em condições de campo;

- A refrigeração do sêmen da jaguatirica, seguida pela sua pré-incubação por duas horas em condições adequadas à capacitação espermática do sêmen felino, permitiu a conclusão da capacitação por uma fração significativa da população de espermatozoides;
- A verificação da capacitação espermática apenas entre as amostras refrigeradas indica que o fenômeno de criocapacitação pode ter precipitado o término da capacitação entre essas amostras, em comparação às amostras transportadas à temperatura ambiente;
- As condições de incubação do ensaio de reação acrossômica induzida pelo cálcio ionóforo A23187 foram desfavoráveis ao estudo do fenômeno de capacitação espermática, já que promoveram significativa redução da viabilidade e integridade estrutural dos espermatozoides;
- Resultados mais claros quanto à capacitação dos espermatozoides da jaguatirica poderão ser obtidos em estudos futuros utilizando o ensaio de reação acrossômica induzida pelo cálcio ionóforo A23187 que venham a empregar uma concentração dessa substância maior ou igual a $2\mu\text{M}$ e um tempo de incubação abaixo de 30 minutos;
- A aglutinina do amendoim, conjugada ao isotiocianato de fluoresceína (FITC-PNA) liga-se seletivamente à região correspondente ao acrossomo dos espermatozoides da jaguatirica;
- O iodeto de propídeo (IP) evidencia a região correspondente ao núcleo dos espermatozoides da jaguatirica;
- A proporção de células espermáticas marcadas pelos fluorocromos FITC-PNA e IP não apresentou coerência com o que seria esperado em função da dinâmica da capacitação espermática e reação acrossômica, tendo variado de forma totalmente aleatória ao longo do tempo de pré-incubação;

-
- A utilização dos da técnica mista FITC-PNA / IP na avaliação da viabilidade e integridade acrossomal dos espermatozoides da jagatirica mostrou-se pouco prática, por exigir leitura imediata e equipamento sofisticado de alto custo;
 - A Coloração Simples mostrou-se bastante rápida e prática durante as etapas de fixação e leitura das lâminas, tendo os resultados dessa técnica se mostrado bastante coerentes com a variação esperada da integridade acrossomal durante o período de pré-incubação.

REFERÊNCIAS

- ADANIA, C. H. **Elaboração e análise do registro genealógico da população de jaguatirica (*Leopardus pardalis*) em cativeiro no Brasil**. 2002. 157 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.
- ANDREWS, J. C.; HOWARD, J. G.; BAVISTER, B. D.; WILDT, D. E. Sperm capacitation in the domestic cat (*Felis catus*) and leopard cat (*Felis bengalensis*) as studied with the salt-stored zona pelucida penetration assay. **Molecular Reproduction and Development**, v. 31, p. 200-207, 1992.
- AXNÉR, E.; LINDE-FORSBERG, C.; EINARSON, S. Morphology and motility of spermatozoa from different regions of the epididymal duct in the domestic cat. **Theriogenology**, v. 52, p. 767-778, 1999.
- BAILEY, J. L.; BILODEAU, J. F.; CORMIER, N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. **Journal of Andrology**, v. 24, n. 1, p. 1-7, 2000.
- BARTH, A. D.; OKO, R. J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames: University Press, 1989. 285 p.
- BENSON, G. S. Male sexual function: erection, emission and ejaculation. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. **The physiology of reproduction**. New York: Raven Press, 1988. p. 1121-1139
- BLOM, E. **On the evaluation of the bull semen with special reference to the employment of artificial insemination**. Thesis. Copenhagen, 1950..
- BOUCHARD, G. F.; MORRIS, J. K.; SIKES, J. D.; YOUNGQUIST, R. S. Effect of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoal motility. **Theriogenology**, v. 34, n. 1, p. 147-157, 1990.
- BROWN, J. L.; WILDT, D. E.; PHILLIPS, L. G.; SEIDENSTICKER, J.; FERNANDO, S. B.U.; MITHTHAPALA, S.; GOODROWE, K. L. Adrenal-pituitary-gonadal relationships and ejaculate characteristics in captive leopards (*Panthera pardus kotiya*) isolated on the island of Sri Lanka. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 85, p. 605-613, 1989.
- BYERS, A. P.; HUNTER, A. G.; SEAL, U. S.; BINCZIK, G. A.; GRAHAM, E. F.; REINDL, N. J.; TILSON, R. L. In-vitro induction of capacitation of fresh and frozen spermatozoa of the siberian tiger (*Panthera tigris*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 86, p. 599-607, 1989.

CASSINELLO, J.; ABAIGAR, T.; GOMENDIO, M.; ROLDAN, E. R. S. Characteristics of the semen of three endangered species of gazelles (*Gazella dama mohrr*, *G. dorcas neglecta* and *G. curvieri*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 113, p. 35-45, 1998.

CENTOLA, G. M.; HERKO, R.; ANDOLINA, E.; WEISENSEL, S. Comparison of sperm separation methods: effect on recovery, motility, motion parameters, and hyperactivation. **Fertility and Sterility**, v. 79, n. 8, 173-175, 1998.

CENTOLA, G. M.; MATTOX, J. H.; BURDE, S.; LEARY, J. F. Assessment of viability and acrosomal status of fresh and frozen-thawed human spermatozoa using single wave fluorescence microscopy. **Molecular Reproduction and Development**, v. 27, p. 130-135, 1990.

CEROLINI, S.; MALDJIAN, A.; SURAI, P.; NOBLE, R. Viability, suscetibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. **Animal Reproduction Science**, v. 58, n. 1, p. 99-111, 2000.

CITES (Convention on International Trade of Endangered Species). **Protected species**. Disponível em: < <http://www.cites.org/CITES/eng/append/species.shtml>>. Acesso em: 8 ago. 2000.

CONWAY, W. G. The prospects for sustaining species and their evolution. In: WESTERN D.; PEARL M. (Ed.) **Conservation for the twenty-first century**. New York: Oxford University Press, 1989. p. 189-209.

CROSS, N. L.; MEIZEL, S. Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. **Biology of Reproduction**, v. 41, p. 635-641, 1989.

CUNHA, I. C. N. **Criopreservação do sêmen de cães**. 2002. Tese (Doutorado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2002.

DE JONGE, C. J.; MACK, S. R.; ZANEVELD, L. J. D. Synchronous assay for human sperm capacitation and the acrosome reaction. **Journal of Andrology**, v. 10, n. 3, p. 232-239, 1989.

DONOGHUE, A. M.; JOHNSTON, L. A.; SEAL, U. S.; ARMSTRONG, D. L.; SIMMONS, L. G.; GROSS, T.; TILSON, R. L.; WILDT, D. E. 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**, v. 96, n. 2, p. 555-564, 1992.

DONOGHUE, A. M.; JOHNSTON, L. A.; SEAL, U. S.; ARMSTRONG, D. L.; TILSON, R. L.; WOLF, P.; PETRINI, K.; SIMMONS, L. G.; GROSS, T.; WILDT, D. E. *In vitro* fertilization and embryo development *In vitro* and in vivo in the tiger (*Panthera tigris*). **Biology of Reproduction**, v. 43, p. 733-744, 1990.

- DOOLEY, M. P.; PINEDA M. H. Effect of method of collection on seminal characteristics of the domestic cat. **American Journal of Veterinary Research**, v. 47, n. 2, p. 286-292, 1986.
- DOOLEY, M. P.; PINEDA, M. H.; HOPPER, J. G.; HSU, W. H. Retrograde flow of spermatozoa into the urinary bladder of cats during electroejaculation, collection of semen with an artificial vagina, and mating. **American Journal of Veterinary Research**, v. 52, n. 5, p. 687-691, 1991.
- DOTT, H. M.; MOOR, R. M.; POLGE, C. Artificial insemination with spermatozoa in formaldehyde. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 46, p. 277, 1976.
- DOUGLAS-HAMILTON, D. H.; OSOL, R.; OSOL, G. A field study of the fertility of transported equine semen. **Theriogenology**, v. 22, p. 291-304, 1984.
- DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. **Tratado de anatomia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1990. 567 p.
- EIZIRIK, E.; BONATTO, S. L.; JOHSON, W. E.; CRAWSHAW Jr., P. G.; VIÉ, J. C.; BROUSSET, D. M.; O'BRIEN, S. J.; SALZANO, F. M. Phylogeographic patterns and evolution of the mitochondrial DNA control region in two neotropical cats (Mammalia, Felidae). **Journal of Molecular Evolution**, v. 47, p. 613-624, 1998.
- ENGLAND, G. C. W.; PONZIO, P. Comparison of the quality of frozen-thawed and cooled-rewarmed dog semen. **Theriogenology**, v. 46, n. 1, p. 165-171, 1996.
- EVANS, M. S.; REID, K. H.; SHARP JR., J. B. Dimethyl sulfoxide (DMSO) blocks conduction in peripheral nerve c fibers: a possible mechanism of analgesia. **Neuroscience Letters**, v. 150, p. 145-148, 1993.
- FANTONI, D. T.; CORTOPASSI, S. R. G.; BERNARDI, M. M. Anestésicos Inalatórios. In: SPINOSA, H. S.; GORNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 103-113.
- FELDMAN, E. C. NELSON, R. W. **Canine and feline endocrinology and reproduction**. 2 ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1996. 785 p.
- FORSYTH, S. Administration of a low dose tiletamine-zolazepam combination to cats. **New Zeland Veterinary Journal**, v. 43, n. 3, p. 101-103, 1995.
- GLOVER, T. E.; WATSON, P. F. Cold shock and its prevention by egg yolk in spermatozoa of the cat (*felis catus*). **Cryo Letters**, v. 6, p. 239-244, 1985.
- GOODROWE, K. L.; HAY, M. Characteristics and zona binding ability of fresh and cooled domestic cat epididymal spermatozoa. **Theriogenology**, v. 40, p. 967-975, 1993.

GUIMARÃES, M. A. B. V. A aplicação de técnicas de reprodução assistida em animais silvestres mantidos em cativeiro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, n. 2, p. 116-117, 2001.

HAFEZ, E. S. E. (Ed.). **Reproduction in farm animals**. 5 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1987. 649 p.

HARRIS, R. F.; POPE, C. E.; GOMEZ, M. C.; LEIBO, S. P.; DRESSER, B. L. Storage of domestic cat spermatozoa for extended periods at 4°C. **Theriogenology**, v. 55, n. 1, p. 308, 2001

HARRISON, R. A. P. Capacitation mechanisms, and the role of capacitation as seen in eutherian mammals. **Reproduction Fertility and Development**, v. 8, p. 581-594, 1996

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

HAY, M. A.; KING, W. A.; GARTLEY, C. J.; LEIBO, S. P.; GOODROWE, K. L. Canine spermatozoa cryopreservation and evaluation of gamete interaction. **Theriogenology**, v. 48, n. 8, p. 1329-1342, 1997.

HOWARD, J. G. Assisted reproductive techniques in non domestic carnivores. In: FOWLER, M. E.; MÜLLER, R. E. (Ed.). **Zoo and wild animal current therapy**. 4 ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1999. p. 449-457.

HOWARD, J. G. Semen collection and analysis in carnivores. In: FOWLER, M. E. **Zoo and wild animal medicine current therapy**. 3 ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1993. p. 390-399.

HOWARD, J. G.; BARONE, M. A.; BUSH, M. A heterologous salt-stored zonae pellucidae assay for assessing sperm capacitation and the impact of teratospermia in the cheetah (*Acinonyx jubatus*). In: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF ANDROLOGY, 1991, [S.I.]. **Proceedings...** p. 101.

HOWARD, J. G.; BARONE, M. A.; CLINGERMAN, K. J.; BUSH, M.; WILDT, D. E. Influence of teratospermia, culture media and a sperm swim-up technique on penetration of zona-free hamster ova by domestic cat spermatozoa. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 11., 1988, Dublin. **Proceedings...** p. 332.

HOWARD, J. G.; BUSH, M.; HALL, L. L.; WILDT, D. E. Morphological abnormalities in spermatozoa of 28 species of non-domestic felids. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 10., 1984, [S.I.]. **Proceedings...** v. 2, p. 57.

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

IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis) **Lista oficial de animais ameaçados de extinção**. Disponível em: <[http://www. Ibama.gov.br/](http://www.Ibama.gov.br/)>. Acesso em: 15 de agosto de 2000.

IRVINE, S. Computer assisted semen analysis systems: sperm motility assessment. **Human Reproduction**, v. 10, p. 53-50, 1995. Supplementum 1.

LONG, J. A.; WILDT, D. E.; WOLFE, B. A.; CRITSER, J. K.; DEROSI, R. V.; HOWARD, J. Sperm capacitation and the acrosome reaction are compromised in teratospemic domestic cats. **Biology of Reproduction**, v. 54, p. 638-646, 1996.

MALLORY, S. B.; LEHMAN, P. A.; VANDERPOOL, D. R.; THOMAS, J. F. Topical lidocaine for anesthesia in patients undergoing pulsed dye laser treatment for vascular malformations. **Pediatric Dermatology**, v. 10, n. 4, p. 370-375, 1998.

MALMGREN, L. Effectiveness of two systems for transporting equine semen. **Theriogenology**, v. 50, n. 4, p. 833-839, 1998.

MICROSOFT EXCEL. **Microsoft® Excel 2002**. [S.l.]: Microsoft Corporation, 2001.

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

MORAIS, R. N. **Fisiologia reprodutiva de pequenos felinos (*Leopardus pardalis* LINNAEUS, 1758; *Leopardus wiedii*, SCHINZ, 1821; *Leopardus tigrinus*, SCHREBER, 1775)**: sobre a função testicular (gametogênica e esteroidogênica) de machos em cativeiro, incluindo variações sazonais. 1999. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. São Paulo, 1999.

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

MORATO, R. G. **Reprodução em onça pintada *Panthera onca* (Linnaeus, 1758): avaliação do método para contenção e para obtenção de sêmen, caracterização do ejaculado, biometria testicular, níveis séricos de testosterona e sazonalidade**. 1997. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

MORATO, R. G.; CRICHTON, E. G.; PAZ, R. C. P.; ZUGE, R. M.; MOURA, C. A.; NUNES, A. L. V.; TEIXEIRA, R. H.; PORTO-NETO, L. R.; MAHLMEISTER, P.; GUIMARÃES, M. A. B. V.; CORRÊA, S. H. R.; BARNABE, V. H.; BARNABE, R. C.; ARMSTRONG, D. L.; LOSKUTOFF, N. M. Ovarian stimulation and successful in vitro fertilization in the jaguar (*Panthera onca*). **Theriogenology**, v. 53, p. 339, 2000

MORATO, R. G.; GUIMARÃES, M. A. B. V.; NUNES, A. L. V.; TEIXEIRA, R. H.; CARCIOFI, A. C.; FERREIRA, F.; BARNABE, V.H.; BARNABE, R. C. Colheita e avaliação espermática em onça pintada (*Panthera onca*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 35, p. 178-181, 1998.

MORATO, R. G.; QUEIROZ, V. S.; WILDT, D.E.; SPINDLER, R. E. Effects of medium-term storage of neotropical cat sperm prior to cryopreservation. In: CONGRESSO DE INTEGRAÇÃO EM BIOLOGIA DA REPRODUÇÃO, 2003, Ribeirão Preto. **Anais...1** CD-ROM.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of cats**. Washington D. C.: National Academy Press, 1986. p. 78

NIWA, M. M.; OHARA, K.; IRITANI, A. Early events of *In vitro* fertilization of cat eggs by epididymal spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 75, p. 657-660, 1985

NORTON, T. M.; ADAMS, W. H.; KOLLIAS, G. V.; CLYDE, V. L. Medical and surgical management of benign prostatic hyperplasia, diskospondylitis, and penile paresis in an ocelot. **JAVMA: Reports on Wildlife and Laboratory Animals**. v. 197, n. 5, p. 630-632, 1990.

NOWELL, K.; JACKSON, P. **Wild cats: status survey and conservation action plan**. Gland: IUCN (World Conservation Union), 1996. 382 p.

OLIVEIRA, T. G. **Neotropical cats ecology and conservation**. São Luís: Editora da Universidade Federal do Maranhão, 1994. 220 p.

OLIVEIRA, T. G.; CASSARO, K. **Guia de identificação de felinos brasileiros**. 2 ed. São Paulo: Sociedade de Zoológicos Brasil, 1999. 60 p.

PAZ, R. C. R. **Influência nutricional sobre a produção e qualidade do sêmen de onças pintadas (*Panthera onca*, Linnaeus, 1758) mantidas em cativeiro**. 2000. 102 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

PAZ, R. C. R.; ZUGUE, R. M.; FELIPPE, P. A. M.; BARNABÉ, V. H.; BARNABÉ, R. C.; MORATO, R. M. Capacidade de penetração do semem congelado de onça pintada (*Panthera onca*) em oócitos heterólogos. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v. 27, n. 1, p. 274, 1999.

PINEDA, M. H.; DOOLEY, M. P.; MARTIN, P. A. Long term study on the effects of electroejaculation on seminal characteristics of the domestic cat. **American Journal of Veterinary Research**, v. 45, n. 5, p. 1038-41, 1984.

PINTADO, B.; FUENTE, J. de la; ROLDAN, E. R. S. Permeability of boar and bull spermatozoa to the nucleic acid stains propidium iodide or Hoescht 33258, or to eosin: accuracy in the assessment of cell viability. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 118, n. 1, p. 145-152, 2000.

PLATZ, C. C.; SEAGER, W. J. Semen collection by electroejaculation in the domestic cat. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 173, n. 10, p. 1353-1355, 1978.

PLATZ, C. C.; WILDT, D. E.; SEAGER, W. J. Pregnancy in the domestic cat after artificial insemination with previously frozen spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 52, p. 279-82, 1978.

POPE, C. E.; GLEWICKS, E. J.; WACHS, K. B.; KEELER, G. L.; DRESSER, B. L. In vitro fertilization in the domestic cat (*Felis catus*): a comparison between freshly collected and cooled semen. **Theriogenology**, v. 31, n. 1, p. 241, 1989.

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

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

PUKAZHENTHI, B. S.; WILDT, D. E.; OTTINGER, M. A.; HOWARD, J. Compromised sperm protein phosphorylation after capacitation, swim-up, and zona pellucida exposure in teratospermic domestic cats. **Journal of Andrology**, v. 17, n. 4, p. 409-419, 1996.

PUKAZHENTHI, B. S.; WILDT, D. E.; OTTINGER, M. A.; HOWARD, J. Inhibition of domestic cat spermatozoa acrosome reaction and zona pellucida penetration by tyrosine kinase inhibitors. **Molecular Reproduction and Development**, v. 49, p. 48-57, 1998.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; LARSSON, B.; ZHANG, B. R.; SÖDERQUIST, L. In vitro assessment of viability and fertilizing capacity of bull spermatozoa. **Journal of Reproduction and Development**, v. 43, n. 1, p. 1-11, 1997.

ROTA, A.; PEÑA, A. I.; LINDE-FORSBERG, C.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. In vitro capacitation of fresh, chilled and frozen-thawed dog spermatozoa assessed by the clortetracycline assay and changes in motility patterns. **Animal Reproduction**, v. 57, p. 199-215, 1999.

ROTH, T. L. Gamete biotechnology for assisting reproduction in endangered species. In: AMERICAN ASSOCIATION OF ZOO VETERINARIANS ANNUAL MEETING, 1993, [S. l.]. **Proceedings**: p. 277-280.

ROTH, T. L.; SWANSON, W. F.; COLLINS, D.; BURTON, M.; GARELL, D. M.; WILDT, D. E. Snow leopard (*Panthera uncia*) spermatozoa are sensitive to alkaline pH, but motility In vitro is not influenced by protein or energy supplements. **Journal of Andrology**, v. 17, n. 5, p. 558-566, 1996.

SHAFIK, A. Pelvic floor muscles and sphincters during erection and ejaculation. **Archives of Andrology**, v. 39, p. 71-78, 1997.

SHORT, C. E. Inhalant anesthetics. In: _____ (ed.) **Principles and practice of veterinary anesthesia**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1987. p. 70-90.

SIGMA-ALDRICH. **Products for life science research**: 2003-2004. Saint Louis: Sigma Aldrich Corporation, 2002

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. **SAS user's guide**: statistics. Cary: SAS Institute, 2000.

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

SWANSON, W. F.; JOHNSON, W. E.; CAMBRE, R. C.; CITINO, S. B.; QUIGLEY, K. B.; BROUSSET, D. M.; MORAIS, R. N.; MOREIRA, N.; O'BRIEN, S. J.; WILDT, D. E. Reproductive status of endemic felid species in latin american zoos and implications for ex situ conservation. **Zoo Biology**, 2003. No prelo.

SWANSON, W. F.; WILDT, D. E. Comparative sperm function and gamete interaction among small felid species from divergent evolutionary lineages. **Biology of Reproduction**, v. 58, p. 176, 1998. Supplementum 1. Trabalho apresentado à 31. Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, College Station, Texas, EUA, 1998 - Resumo n. 334.

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

SWANSON, W. F.; WILDT, D. E.; CAMBRE, R. C.; CITINO, S. B.; QUIGLEY, K. B.; BROUSSET, D. M.; MORAIS, R. N.; MOREIRA, N.; O'BRIEN, S. J.; JOHNSON, W. E. Reproductive survey of endemic felid species in latin american zoos: male reproductive status and implications for conservation. In: AMERICAN ASSOCIATION OF ZOO VETERINARIANS ANNUAL MEETING, 1995, Houston. **Proceedings**: p. 374-380.

TAMULI, M. K.; WATSON, P. F. Use of simple staining technique to distinguish acrosomal changes in the live sperm sub-population. **Animal Reproduction Science**, v. 35, p. 247-254, 1994.

VISCONTI, P. E.; WESTBROOK, V. A.; CHERTIHIN, I.; DEMARCO, I.; SLEIGHT, S.; DIECKMAN, A. B. Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 53, p. 133-150, 2002.

WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction Fertility and Development**, v. 7, p. 871-891, 1995.

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

WILDT, D. E. Male reproduction: assessment, management, and control of fertility. In: KLEIMAN, D. G.; ALLEN, M. E.; THOMPSON, K. V.; LUMPKINS, S. **Wild mammals in captivity: principles and techniques**. Chicago: University of Chicago Press, 1996. p. 429-450.

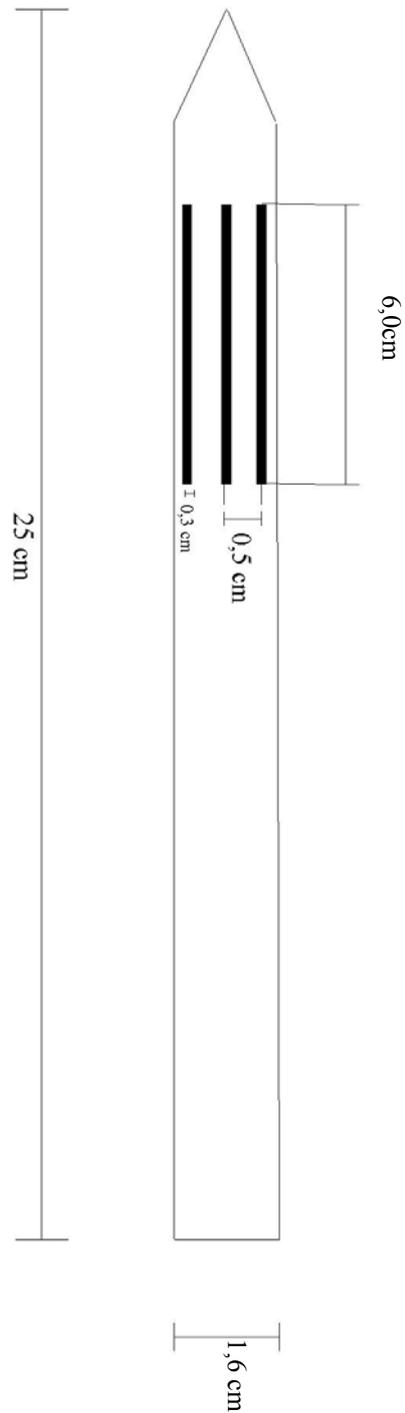
WILDT, D. E.; BUSH, M.; GOODROWE, K. L.; PACKER, C.; PUSEY, A. E.; BROWN, J. L.; JOSLIN, P.; O'BRIEN, S. J. Reproductive and genetic consequences of founding isolated lion populations. **Nature**, v. 329, p. 328-31, 1987.

WILDT, D. E.; BUSH, M.; HOWARD, J. G.; O'BRIEN, S. J.; MELTZER, D.; DYK, A. V.; EBEDES, H.; BRAND, D. J. Unique seminal quality in the south african cheetah and a comparative evaluation in the domestic cat. **Biology of Reproduction**, v. 29, p. 1019-1025, 1983.

WILDT, D. E.; BUSH, M.; O'BRIEN, S. J. **Training manual: Reproduction, Genetics and Veterinary Medicine**. Front Royal: Center for New Opportunities in Animal health Sciences (NOAHS), Conservation and Research Center, National Zoo, Smithsonian Institution, 1993. Manual.

WOELDERS, H. Overview of *In vitro* methods for evaluation of semen quality. **Reproduction of Domestic Animals**, p. 145-164, 1991. Supplement 1.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. **The physiology of reproduction**. 2 ed. New York: Raven Press, 1994. p. 189-317.

ANEXOS**ANEXO 1 – Sonda retal de dimensões adequadas à eletroejaculação de jaguatiricas**

ANEXO 2 - Preparo da Variante do Diluente de Platz (PDV)

Ingredientes:

- 20% gema de ovo
- 11% de lactose (SIGMA, cod. L 1768)
- Água bidestilada
- 1000UI Penicilina G / ml de diluente
- 1mg Estreptomicina / ml de diluente

Foram preparados 100 ml de diluente; para tanto:

1. Pesaram-se 11 g de lactose que foram dissolvidos em ~70ml de água bidestilada. A dissolução foi realizada com auxílio de um agitador magnético por cerca de 30 minutos;
2. Após a quebra do ovo, a clara foi desprezada, e a gema foi depositada em um papel de filtro para secagem da membrana vitelínica. Esta foi perfurada e a foram recolhidos 20 ml de gema em uma proveta;
3. Este volume de gema foi misturado à solução de lactose e a essa mistura foram acrescentados 100mg de Penicilina G e 100mg de Estreptomicina;
4. O pH foi ajustado para 7,0 com NaOH;
5. Acrescentou-se água bidestilada Q. S.P. 100ml;
6. Centrifugou-se a suspensão a 5°C por 30 minutos a 9000 x G;
7. Descartou-se o gel presente na parte superior do tubo e aliquotou-se o sobrenadante em criotubos, que foram armazenados em nitrogênio líquido até o momento da utilização.

ANEXO 3 – Preparo do meio F10 de Ham com 5% de SFB

O meio de Ham utilizado (Meio Nutriente de Ham, 100ml) foi obtido da empresa Nutricell[®] (Campinas, São Paulo, Brasil). A este meio foram acrescentadas as seguintes substâncias, de acordo com o Manual de Treinamento do NOAHS (WILDT; BUSH; O'BRIEN, 1993):

- Soro Fetal Bovino (SFB, 5ml), inativado pelo calor (Nutricell[®]), à concentração de 5%;
- Penicilina G e estreptomicina à concentração de 1 mg/ml cada;
- Piruvato (SIGMA, cód. G7029) à concentração de 0,026 mg/ml;
- Glutamina (SIGMA, cód. P8574) à concentração de 0,284 mg/ml.

O preparo desta solução era sempre feito na noite anterior ou na manhã do dia da realização de cada ensaio, sendo este meio mantido em incubadora de CO₂, até o momento de sua utilização, para equilíbrio do pH. No entanto os antibióticos, diferentemente das demais substâncias, eram acrescentados diretamente ao frasco do Meio Nutriente F10 de Ham no dia em que este era aberto pela primeira vez, evitando assim a contaminação do meio restante, que não era utilizado no mesmo dia.

ANEXO 4 – Preparo do *Corante Simples* de POPE

Ingredientes:

- Fosfato dibásico 0,2 M (Na₂HPO₄) (0,284 g/ 10 ml H₂O) – SIGMA cód. S 0876
- Ácido cítrico 0,1 M (0,192 g/ 10 ml H₂O) – SIGMA cód. C 0759
- Corante rosa bengala – (Rose Bengal - Certified, Sigma cód. R4507)
- Corante "Fast green" – (Fast Green FCF, Merck cód. 1. 04022.0025)
- Etanol (PA)

Para o preparo da solução tampão foi utilizado 16,5 ml da solução 0,2 M de fosfato dibásico misturados a 3,5 ml da solução 0,1 M de ácido cítrico. O pH final dessa solução foi ajustado para 7 com NaOH e/ou HCl quando necessário.

Foram preparados 20 ml de corante, misturando-se 8 ml de álcool etílico com 12 ml da solução tampão. À essa solução foram então adicionados 200 mg do corante rosa bengala em pó e 200 mg do corante "fast green" em pó. Esse corante foi então acondicionado à temperatura ambiente e protegido da luz (em recipiente âmbar e com revestimento externo de papel alumínio).

ANEXO 5 – Preparo das Soluções de FITC-PNA e IP

Pouco antes do início de cada ensaio de avaliação dos fluorocromos, era preparado 1ml da **solução de trabalho**, composta pelas seguintes soluções:

- 960µl de Citrato de sódio (ECIBRA, cód. 1669) 3%;
- 10µl de formaldeído (40%) diluído na proporção 1:80 em NaCl 0,9%;
- 10µl de solução mãe de FITC-PNA;
- 20µl de solução mãe de IP.

As soluções de citrato de sódio e de formaldeído foram sempre preparadas com, no máximo, 48 horas de antecedência. As soluções mãe foram preparadas conforme descrito abaixo. Vale salientar que toda manipulação dessas substâncias fluorescentes foi feita com o mínimo de luz possível, visando evitar a diminuição da intensidade da fluorescência emitida pelos fluorocromos.

Solução mãe de IP - 10 mg de iodeto de propídeo (Sigma, cód. P4170) diluídos em 20 ml de solução fisiológica.

Solução mãe de FITC-PNA - 1 mg de PNA conjugado ao FITC (*Arachis hypogaea* aglutinin, FITC – fluorescein isotiocianate – conjugated; ICN, cód. 153238) diluído em 1 ml de PBS.

Anexo 6 – Preparo das Soluções de DMSO e Cálcio Ionóforo A23187

Uma vez que a massa de Ca^{2+}Ion ("Calcium Ionophore A23187, Free acid; Sigma, Product Number: C7522") presente na embalagem original do produto era de apenas 5mg considerou-se conveniente diluir todo produto, diretamente em sua embalagem, com o volume adequado de DMSO, evitando perdas e erros de pesagem.

Soluções Estoque:

- *Solução Mãe $\text{Ca}^{2+}\text{Ion}/\text{DMSO}$* : 5mg de Ca^{2+}Ion foram diluídos em 2,387ml de DMSO P.A., permitindo uma concentração de Ca^{2+}Ion nessa solução igual a 4mM (2,0947mg/ml).
- *Solução estoque DMSO*: 25 μl de DMSO P.A. foram diluídos em 975 μl do meio F10 de Ham, permitindo a concentração de 2,5% do DMSO. Essa solução foi dividida em alíquotas de 20 μl , colocadas em tubos de microcentrífuga e mantidas a - 20°C, até o dia do ensaio.
- *Solução Estoque Ca*: 25 μl da *Solução Mãe $\text{Ca}^{2+}\text{Ion}/\text{DMSO}$* foram diluídos em 975 μl do meio F10 de Ham, permitindo a concentração de 2,5% para o DMSO e 100 μM (52,368 $\mu\text{g}/\text{ml}$) para o Ca^{2+}Ion . Essa solução foi dividida em alíquotas de 30 μl , colocadas em tubos de microcentrífuga e mantidas a - 20°C, até o dia do ensaio.

Soluções de Trabalho:

- *Solução Branca*: no dia do ensaio, 10 μl da *Solução estoque DMSO* foram acrescidos a 490 μl do meio F10 de Ham c/ 5%SFB recém preparado, permitindo a concentração de 0,05% de DMSO.
- *Solução Ca2*: no dia do ensaio, 10 μl da *Solução Estoque Ca* foram diluídos em 490 μl do meio F10 de Ham c/ 5%SFB recém preparado, permitindo a concentração de 0,05% para o DMSO e 2 μM (1,047 $\mu\text{g}/\text{ml}$) para o Ca^{2+}Ion .
- *Solução Ca4*: no dia do ensaio, 20 μl da *Solução Estoque Ca* foram diluídos em 480 μl do meio F10 de Ham c/ 5%SFB recém preparado, permitindo a concentração de 0,1% para o DMSO e 4 μM (2,094 $\mu\text{g}/\text{ml}$) para o Ca^{2+}Ion .